Aus dem Bundesgesundheitsamt - Abteilung für Veterinärwesen -
Leitender Direktor: Prof. Dr. M. Zunker

EINFLUSS VON TROCKNUNGSMETHODE UND RESTFEUCHTIGKEIT AUF DIE ÜBERLEBENSRATE UND DIE LAGERUNGSSTABILITÄT GETROCKNETER BRUCELLA ABORTUS- UND SALMONELLA ABORTUS OVIS-KULTUREN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Eckhard Scheibner
Tierarzt aus Zittau/Sachs.
Berlin 1961

Journal-Nr. 342

Druck:

Ernst - Reuter - Gesellschaft
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.

Dissertations-Druckstelle

Berlin - Dahlem, Garystrasse 45, Tel.: 76 52 61, App. 668

Aus dem Bundesgesundheitsamt - Abteilung für Veterinärwesen -
Leitender Direktor: Prof. Dr. M. Zunker

EINFLUSS VON TROCKNUNGSMETHODE UND RESTFEUCHTIGKEIT AUF DIE ÜBERLEBENSRATE UND DIE LAGERUNGSSTABILITÄT GETROCKNETER BRUCELLA ABORTUS- UND SALMONELLA ABORTUS OVIS-KULTUREN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Eckhard Scheibner
Tierarzt aus Zittau/Sachs.
Berlin 1961

Journal-Nr. 342

Gedruckt mit Genehmigung
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. L. F. Müller
Referent: Prof. Dr. F. Ulbrich
Korreferent: Prof. Dr. H. Hartwigk

Tag der mündlichen Prüfung: 21. 7. 1961

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung 5

II. Literaturübersicht

1. Historische Entwicklung der bakteriellen Trockenkonservierung 7
2. Die Schutzlösung 13
3. Das Einfrieren und die Trocknungstemperatur 15
4. Trocknungsdauer und Restfeuchtigkeit 18
5. Die Lagerung 18

III. Eigene Versuche

1. Material 21
2. Methodik 21
3. Versuchsergebnisse 25
   a) Versuche mit Brucella abortus 26
   b) Versuche mit Salmonella abortus ovis 36
   c) Der Temperaturverlauf im Trockengut 46
   d) Die Bestimmung der Restfeuchtigkeit 47

IV. Besprechung der Versuchsergebnisse und Diskussion 50

V. Zusammenfassung 56

VI. Literaturverzeichnis 59

VII. Lebenslauf 67

I. Einleitung

Das Prinzip der Trockenkonservierung von Bakterien hat als erfolgreiche biologische Arbeitsmethode ein weites Anwendungsbereich gefunden. Es beruht auf der Eigenschaft der Bakterienzelle, unter dem Einfluß des Wasserentzuges in ein Stadium latenten Lebens überzugehen, in dem sie, vergleichbar dem Zustand der Spore, schädigenden Umwelteinflüssen eine gesteigerte Widerstandskraft entgegensetzt. Die Lebensfähigkeit derart vorbehandelter bakterieller Präparate kann jahrelang erhalten werden, wenn man verhindert, daß durch Hinzutritt von Feuchtigkeit und Luft chemische Umsetzungen innerhalb des Trokkengutes in Gang kommen. Die durch Wiederbewässerung und Inkubation in geeignetem Milieu gewonnenen Subkulturen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer morphologischen, kulturellen und biologischen Eigenschaften nicht von denen des Ausgangsmaterials. Dieses Leistungsvermögen der Trockenkonservierung sicherte ihre starke Verbreitung auf allen bakteriologischen Arbeitsgebieten, in denen Mikroorganismen bei Gewährleistung ihrer biologischen Konstanz über längere Zeiträume gelagert werden müssen. So bietet sie beispielsweise der herkömmlichen Anlage von Stammsammlungen gegenüber den Vorteil, daß das turnusmäßige Überimpfen mit seinem hohen Arbeits- und Materialaufwand wegfällt und weitere Unsicherheitsfaktoren, wie Verunreinigungen oder das Entstehen von Dissoziationsformen vermieden werden. Sie ermöglicht die sofortige, sichere Konservierung von frisch isolierten Keimen, gestattet jederzeit das Zurückgreifen auf bekannte Vergleichs-, Test- oder Produktionsstämme und erlaubt ihren weniger aufwendigen Versand. Da die angeschnittenen Fragen zuvor nur unbefriedigend gelöst waren, ist es erklärlich, daß die Trockenkonservierung von Bakterien heute in großem Maßstab in der systematischen Bakteriologie, der Seuchenforschung, der Impfstoff- und Vitaminherstellung sowie der Gärungstechnik Anwendung findet.

Die Entwicklung der Trockenkonservierung ist auf zwei verschiedene Quellen zurückführbar. Das erste und ältere Verfahren, die Lebenderhaltung von Bakterien durch Eintrocknung aus flüssiger Phase, war zunächst nicht als Konservierungsprinzip gedacht, sondern war Gegenstand epidemiologischer Untersuchungen, in denen die Austrocknungsresistenz verschiedener Infektionserreger bestimmt werden sollte (GUANIERI 1888, KITASATO 1889, FICKER 1898).

Dabei zeigte sich, daß die Bakterien nicht allein die Trocknung überstanden, sondern auch nach längerer Lagerung nicht abgestorben waren. Aufgrund dieser Erfahrungen entwickelte sich hieraus ein Konservierungsprinzip, über dessen erfolgreiche Anwendung viele Autoren berichteten. In der Folgezeit wurde dieses Verfahren jedoch immer mehr von einem zweiten, der Vakuumgefriertrocknung verdrängt. Hierüber berichtete als erster ALTMANN (1890), der jedoch noch keine Bakterien trocknete. Das Hauptverdienst in der Förderung der Gefriertrocknung gebührt SHACKELL (1909), der in weit vorausschauender Weise auf die vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten hinwies. Seitdem konzentrierte sich das Interesse der meisten Autoren fast aus-

schließlich auf letztere Methode, und das Schrifttum ist reich an theoretischen Erwägungen und praktischen Anregungen zur Erzielung optimaler Ergebnisse. Um quantitativ hohe Ausbeuten, d. h. Überlebensraten, zu erhalten, ist aufgrund der zahlreichen Veröffentlichungen folgenden Faktoren besondere Beachtung zu widmen: der Schutzlösung, der Einfriermethode, der Trocknungstemperatur, der Trocknungsdauer (Restfeuchtigkeit) und den Lagerungsbedingungen.

In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, an zwei der Trockenkonservierung gegenüber relativ empfindlichen Keimen:

1) Brucella abortus bovis St. Buck 19

2) Salmonella abortus ovis

verschiedene Trocknungs- und Gefriertrocknungsverfahren zu prüfen. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand dabei die Lebendkeimzahlbestimmung in Proben unterschiedlicher Restfeuchtigkeit (Trocknungsdauer) unmittelbar nach Trocknungsabschluß sowie nach etwa halbjähriger Lagerung. Die Trocknungen wurden am Glaskamm nach einer modifizierten Technik von FLOSDORF-MUDD durchgeführt.

II. Literaturübersicht

1. Historische Entwicklung der bakteriellen Trockenkonservierung

Von den grundlegenden Arbeiten R. Kochs und L. Pasteurs gingen die Impulse aus, die zur Jahrhundertwende allenthalben eine intensive Seuchenforschung anregten. Bei der Klärung epidemiologischer Fragen ergab sich die Notwendigkeit, exakte Aussagen über die Widerstandsfähigkeit von Seuchenerregern gegenüber der Austrocknung machen zu können. GUANIERI (1888), KITASATO (1889), GERMANO (1897) und FICKER (1898, 1908) griffen dieses Problem auf und prüften unter den Bedingungen der Luft- und Exsikkatortrocknung eine Vielzahl von Keimen. Dabei stellte es sich heraus, daß der relativ rasche Wasserentzug bei der Exsikkatortrocknung für das Überleben der Erreger günstiger ist. FICKER (1898) konnte beispielsweise Choleravibrionen durch Exsikkatortrocknung 120 Tage am Leben erhalten gegenüber nur 8 Tagen bei Lufttrocknung. HEIM (1905, 1907) unterzog eine große Anzahl von Bakterienarten der Exsikkatortrocknung und verzeichnete besondere Erfolge bei Pneumokokken, Typhus- und Diphtheriebazillen, die er über ein Jahr bei voller Virulenz lebend erhalten konnte. Micrococcus tetragemes wies erst nach 5jähriger Lagerung einen merklichen Lebendkeimverlust auf. Er empfiehlt die Exsikkatortrocknung als Konservierungsprinzip für den Seuchendienst und für gerichtlich-medizinische Zwecke, schließt aber eine Anzahl Erreger, wie Past. multocida, Vibrionen, Gonokokken und Meningokokken wegen ihrer Empfindlichkeit aus.

Weiter vervollkommnet wurde das Verfahren durch BROWN (1925, 1926, 1932) und OTTEN (1930), die zur Vakuumexsikkatortrocknung übergingen. BROWN trocknete im partiell evakuierten $CaCl_2$-Exsikkator Bakteriensuspensionen auf Fließpapier und lagerte ursprünglich im Exsikkator, später in evakuierten Milchflaschen. Seine Präparate zeichneten sich durch hohe Haltbarkeit aus; so waren Streptokokken noch nach 12 Jahren, Pneumokokken (Typ I, II und III) nach 8, Corynebact. pyog. st. nach 8, Bact. bronchisepticum nach 6 Jahren kultivierbar. OTTEN hingegen trocknete im Vakuumexsikkator über conc. H_2SO_4 und lagerte seine Präparate in evakuierten Glasampullen. Er ist der erste Autor, von dem genaue quantitative Angaben vorliegen: Die erzielten Überlebensraten rangierten von 2,5 - 5 % bei Typhusbazillen, von 0,05 - 0,005 % bei Dysenteriebazillen und von 0,016 - 0,0001 Prom. bei Vibrio cholerae. Vakuumtrocknung und -lagerung werden von ihm als brauchbares Konservierverfahren empfohlen.

Eine weitere Modifikation dieser Trocknungsmethode stammt von LEIFSON (1936), der Suspensionen einer Reihe von Bakterien in angebohrte Glasperlen abfüllte und diese in gestopften Reagenzgläsern der Vakuumexsikkatortrocknung bei 0,01 Torr unterzog. Ihm gelang es, auf diese Weise auch empfindliche Keime, wie Meningokokken, Choleravibrionen und Brucellen zu konservieren. Ausschlaggebend für eine gute Haltbarkeit ist seiner Meinung nach die Gewährleistung eines hohen Vakuums auch während der Lagerung, ein Moment, das er bei der BROWN'schen Technik vermißt. Von besonderem Interesse ist

die Arbeit STAMP's (1947), der vergleichend Vakuumexsikkator- und Gefriertrocknungen durchführte. Er trocknete auf gewachsten Filtrierpapierstreifen über P_2O_5 bei 100 - 300 Torr, 2 - 3 Tage lang und lagerte das Trockengut in gestopften Röhrchen im Exsikkator. Bei Verwendung von Chromobact. prodigiosum als Testkeim zeigte es sich, daß die Überlebensraten nach Exsikkatortrocknung etwa das 3fache jener der Gefriertrocknungen betrugen, womit die Überlegenheit der ersten Methode sinnfällig demonstriert wurde. Auch STAMP betont, daß die Trocknungsresistenz mancher Keime, z.B. V. cholerae und N. meningitidis, nur unvollkommen ist. Die Mehrzahl der geprüften Keime war jedoch gut konservierbar. Es ergab sich etwa folgende Reihe zunehmender Empfindlichkeit: Pyogenes-Streptokokken, Paratyphus-Coli-Gruppe, Pasteurellen. Hervorzuheben ist noch das Ergebnis einer Bruc. melitensis-Trocknung, deren Ausgangsüberlebensrate von 77 % während 4jähriger Lagerung bei Zimmertemperatur auf 17,3 % zurückging. WEISER und HENNUM (1947) stellten bei E.coli ebenfalls Trocknung aus flüssiger Phase und Gefriertrocknung gegenüber und konnten bezüglich der Uberlebensraten ein um 10 - 15 % besseres Abschneiden der Lyophilisation beobachten. Über vergleichende Untersuchungen berichteten in jüngster Zeit SCHMIDT, FELDMANN, DOBBERSTEIN (1958) und FELDMANN (1959), die 100 Bakterienstämme aus 56 Arten der Trocknung und der Gefriertrocknung unterzogen. Sie trockneten am freihängenden Rechen bei Zimmertemperatur unter Verwendung einer Gasballastpumpe und lagerten in vakuumdicht abgezogenen Glasampullen. Die Überlebensraten der aus flüssiger Phase getrockneten Proben lagen durchweg höher, auch nach 1/2jähriger Lagerung. Besonders deutlich war dies bei den empfindlichen Meningo- und Gonokokken sowie bei 3 (von 6) Pneumokokkenstämmen ausgeprägt. Die biologischen Eigenschaften sämtlicher Stämme waren vor der Konservierung genau festgelegt worden. Ihre Überprüfung ergab nach halbjähriger Lagerung in den Präparaten bei der Trocknungsverfahren keine Abweichungen. Aufgrund ihrer günstigen Erfahrungen halten sie die einfache Trocknung aus flüssiger Phase für besonders geeignet zur Konservierung von Mikroben. Diese Methode erfordert nur einen geringen apparativen Aufwand, braucht während des Prozesses kaum kontrolliert zu werden und ist trotzdem von hoher Leistungsfähigkeit und erlaubt auch die Behandlung empfindlichen Bakterienmaterials.

Trotzdem wurde nach diesem Prinzip immer nur vereinzelt gearbeitet, und es trat schließlich ganz in den Hintergrund, als das zweite Verfahren, die Vakuumgefriertrocknung, bekannt wurde. Die physikalische Grundlage dieses Verfahrens bildet die Eigenschaft des Eises, unter reduziertem Druck infolge seiner Wasserdampfspannung zu verdunsten. Um dies bei eingefrorenen Proben in vollem Umfang zu gewährleisten, muß versucht werden, im Rezipienten möglichst niedrige Total- und Partialdruckverhältnisse zu schaffen. Das erstere geschieht mittels leistungsfähiger Vakuumpumpen, das zweite wird durch Abbinden des Wasserdampfes an Punkten stark verminderten Dampfdruckes erreicht. Hierfür sind mit hygroskopischen Chemikalien beladene "Wasserfallen" oder tiefgekühlte Kondensatoren geeignet, an denen sich der Wasserdampf niederschlagen kann. Durch diese Vorrichtungen

wird der Trocknungsprozeß in zweierlei Hinsicht beschleunigt: Einmal kommt es zu einem vermehrten Wasserdampfabtransport infolge des Dampfdruckgefälles zwischen Kondensator und Trockengut, zum anderen wird verhindert, daß sich im Rezipienten Sattdampfverhältnisse einstellen, deren Folge eine verminderte Sublimation wäre. Letzteres beruht auf den enormen Dampfvolumina des Wassers im Vakuum (1 g Wasserdampf bei 10^{-3} Torr und 0^{o} C hat ein Volumen von ca. 1 000 m^3), deren Bewältigung zu klein dimensionierte Pumpen überfordern würde.

Erstmalig wendete ALTMANN (1890) die Gefriertrocknung an, um histologische Präparate zu fixieren. Auch der Amerikaner SHACKELL (1909), der unabhängig von ALTMANN nach diesem Prinzip arbeitete, benutzte es zunächst zur Behandlung von Leberproben, um auf schonende Weise glykolytische Fermente zu inaktivieren, die anschließende Glykogenanalysen gestört hätten. Er fror seine Präparate in Eis-Salz-Mischungen ein, verbrachte sie rasch in einen Exsikkator, der anschließend mit Hilfe einer leistungsfähigen Pumpe evakuiert wurde. Danach wurde die Pumpe abgestellt, und die Trocknung konnte im geschlossenen Exsikkator über conc. Schwefelsäure ablaufen. Um ein Auftauen infolge ansteigenden Partialdruckes zu vermeiden, war ein regelmäßiges Durchmischen der Schwefelsäure erforderlich. In der Folgezeit trocknete er mit bestem Erfolg Immunseren, Meerschweinchenkomplement und virus-fixe-haltiges Kaninchenhirn, dessen Aktivität voll erhalten blieb. Besonders hebt er die gute Löslichkeit des Trockengutes hervor, die bei Anwendung der konventionellen Serumtrocknung nie erreicht wurde. Eine Lagerung unter Ausschluß atmosphärischer Gase wird als unumgänglich angesehen. Zusammenfassend empfiehlt er seine Methode für serologische und histochemische Arbeiten. Nach dem SHACKELL'schen Prinzip konservierte als erster HAMMER (1911) Mikroorganismen. Der Nachweis der Kälteresistenz war vorher u.a. von MACFADYEN (1902) erbracht worden, der zeigte, daß vegetative Bakterienformen die Einwirkung tiefer Temperaturen schadlos überstehen. HAMMER unterzog an Fließpapierstreifen gebundene Bouillonkulturen der Gefriertrocknung. Das SHACKELL'sche Prinzip diente auch ROGERS (1914) als Vorbild, der in großem Umfange Milchsäurebakterien für kommerzielle Zwecke konservierte. Gute Ergebnisse konnten auch mit Bakterien der Coli-gruppe verzeichnet werden. Anfänglich fror er sein Material noch in Eis-Salz-Mischungen ein, ging aber später zu Kohlensäureschnee über. Um die Vitalkeimverluste während der Lagerung möglichst niedrig zu halten, soll unter Vakuum und bei niedrigen Temperaturen (0^{o} C oder tiefer) aufbewahrt werden. Er empfiehlt seine Methode zur Konservierung von Stammsammlungen für Laboratorien.

Diesem Verfahren hafteten aber gewisse Nachteile an, auf die SWIFT (1921) hinwies. Er stellte nämlich oftmals fest, daß Proben, die während des Trocknungsprozesses partiell auftauten, eine gummiartige Beschaffenheit annahmen und nur unvollständig austrockneten, was eine mangelhafte Haltbarkeit zur Folge hatte. Daraufhin modifizierte er die SHACKELL'sche Technik, indem er zur Kühlung des Trockengutes überging. Innerhalb des Exsikkators befand sich, von außen durch

Solen gekühlt, ein Glyzerinbad, welches die Glasröhrchen mit den eingefrorenen Proben aufnahm und ein Auftauen verhinderte. Herrschte im Rezipienten ein Druck von 2 - 3 Torr, so wurde die Pumpe abgeschaltet und die Trocknung nach weiteren 12 Stunden abgebrochen. Als Wasserabsorbens diente Phosphorpentoxyd. Der Verschluß der Röhrchen, die vor der Trocknung mit Wattestopfen versehen worden waren, geschah, nach Hinabschieben des Stopfens, durch Versiegeln mittels Wachses oder durch Zuschmelzen. Er lagerte im Dunkeln bei Zimmertemperatur. Eine ganze Reihe von Bakterienarten, die er nach den beschriebenen Gesichtspunkten lyophilisierte und lagerte, konnten auch nach längeren Zeiträumen weitergezüchtet werden, so z. B. Streptokokken und Pneumokokken nach 40 bis 50 Monaten. Sehr gut ließen sich auch Keime der Typhus-Paratyphusgruppe und Dysenterieerreger konservieren; Meningokokken und Bact. influencae wurden nach 2monatiger Lagerung erfolgreich subkultiviert, während das Verfahren bei den Spirochäten des Rückfallfiebers versagte. Später (SWIFT 1937) modifizierte er sein Verfahren und verwendete an Stelle von Kühlsolen Trockeneis. Die auf -76° C tiefgefrorenen Ampullen wurden in den Exsikkator verbracht und hier durch ein Glyzerin-Trokkeneisbad weitergekühlt. Im Pumpenvorlauf wurde zunächst das Kohlendioxyd entfernt, dann auf 0,03 bis 0,05 Torr evakuiert, die Pumpe abgestellt und über Nacht trocknen gelassen. Der Exsikkator selbst war durch einen trockeneisgekühlten Thermoskasten geschützt. Das auf diese Weise erreichte schonendere Einfrieren und bessere Kühlen ermöglichte weitaus günstigere Resultate als die vorhergehende Methode, insbesondere bei empfindlichen Bakterien. Die Ampullen wurden noch wie früher verschlossen, jedoch erst nach vorausgegangener Flutung des Rezipienten mit über Schwefelsäurebatterien getrockneter Luft. Im gleichen Jahr berichtete er noch über das Ergebnis einer Kontrolle 20jähriger, lyophilisierter Streptokokkenkulturen, die lebend, bei unveränderten Eigenschaften und voller Virulenz angetroffen wurden.

Besondere Verdienste bei der Entwicklung neuer Gefriertrocknungssysteme erwarben sich ELSER, THOMAS und STEFFEN (1935). Schon 1909, nach Bekanntwerden der Arbeiten SHACKELL's, begannen sie ihre Versuche zur Trockenkonservierung von Seren und anderen biologischen Materials. Ein Trocknungsverfahren für Diphtherietoxin, das in der Vakuumkammer gegen eine trockeneisgekühlte Platte versprayt wurde, mußte wegen Gefährdung des Bedienungspersonals aufgegeben werden. Als brauchbare Methode erwies sich schließlich die Lyophilisation am "manifold", einem Trockenrechen mit mehreren Anschlüssen. Die Ampullen wurden am Trocknungsarm aufgesteckt und durch Eintauchen in Eis-Salz-Gemischen eingefroren. Die Absorption des Wasserdampfes erfolgte durch P_2O_5 im Horizontalteil des "manifolds" und in den der Pumpe vorgeschalteten Wasserfallen. Bevor die Ampullen unter Bewahrung des Originalvakuums abgeschmolzen wurden, mußten sie wegen des ungenügenden Wasserabbindungsvermögens des P_2O_5 an einer gleichartigen zweiten Apparatur nachgetrocknet werden. Aus diesem Grunde gingen sie 1929 zur Kühlung des Trockenarmes mit Kohlensäureschnee über, wodurch das Abbinden größerer Wassermengen ermöglicht wurde und die Trocknung in einem Arbeitsgang

durchgeführt werden konnte. Die Pumpe blieb weiterhin durch P_2O_5-Kammern geschützt. Da auch dieses Verfahren noch nicht voll befriedigte, wurden weitere Änderungen vorgenommen: Man legte durch den Trocknungsarm des Manifold eine Kühlschlange, die mit einem Kompressor verbunden war und schaltete der Pumpe jetzt leistungsfähigere, mit Trockeneis beschickte Kältefallen vor. Die geringe Entfernung zwischen Trockengut und Manifoldkondensor ergab ein steiles Partialdruckgefälle, welches in Verbindung mit dem hohen Vakuum von 0,005 - 0,007 Torr außerordentlich kurze Trocknungszeiten gestattete. Demzufolge konnten die Ampullen unmittelbar nach Trocknungsbeginn aus der Kühlsole gehoben werden und blieben wegen des starken Wärmeentzuges bei der Verdampfung eingefroren. Auch das sog. "snap-freezing", eine Methode, bei der das Trockengut unter dem Einfluß der Verdunstungskälte einfriert, wurde ausgeführt, jedoch wegen des Aufschäumens der Objekte wieder verlassen. ELSER und Mitarbeitern gelang es, auch empfindliche Mikroorganismen, wie Spirochaeta duttoni und in einzelnen Fällen sogar Protozoen (Tryp. brucei) erfolgreich zu trocknen. Weiterhin konnten sie N. intracell. und N. gnorrhoeae nach 216monatiger Lagerung anzüchten.

Unabhängig von ihnen entwickelten FLOSDORF und MUDD (FLOSDORF und MUDD 1935) ein ähnliches Verfahren. Ihre Apparatur bestand ebenfalls aus einem Trockenrechen (der jedoch nicht gekühlt wurde), welcher über je einen Primär- und Sekundärkondensator mit einer Vakuumpumpe verbunden war. Die Druckkontrolle erfolgte mittels eines modifizierten McLeods. Zur Kühlung der Kondensatoren und zum Einfrieren des Trockengutes wurde eine CO_2-Eis-Cellosolve-Mischung verwendet. Die durch Sturzkühlung in Ampullen eingefrorenen Proben mußten rasch an den Evakuierungsstutzen befestigt werden und blieben ohne zusätzliche Kühlung unter dem Einfluß des Vakuums gefroren. Dieses durfte den Bereich von 0,01 bis 0,05 Torr nicht überschreiten, wenn ein Auftauen vermieden werden sollte. Außerdem mußten bestimmte Oberflächen-Volumenrelationen eingehalten werden, um den beträchtlichen Wärmetransport zu den freihängenden Ampullen einerseits zu vermindern und andererseits durch forcierte Verdampfung zu kompensieren. Diese Forderungen waren erfüllt, wenn auf 1 cm^2 Verdampfungsoberfläche nicht mehr als 1 - 2 ml Trocknungsgut und höchstens 1,5 - 2 cm^2 jener, der Ampullenwandung anliegenden, wärmeaufnehmenden Fläche entfielen. Kurz nach Trocknungsbeginn stellte sich ein Temperaturgleichgewicht von etwa -17° C ein, das während der Haupttrocknungsphase bestehen blieb. War diese beendet und die Hauptwassermenge entfernt, glich sich das Trockengut der Umgebungstemperatur an. Die Trocknungszeiten waren sehr kurz, da die direkte Einwirkung der Außentemperatur hohe Sublimationsraten zur Folge hatte, die jedoch ihrerseits einen Wärmeentzug bedingten, der Auftauschäden ausschloß. Das Trocknungsgut befand sich in verschiedenen, eigens konstruierten Glasgefäßen, die entweder unter Originalvakuum abgeschmolzen oder oberhalb abquetschbarer Metallringe vom Manifold entfernt werden konnten. 1938 wurde das Verfahren zum "chryochem-process" modifiziert, in dem der Wasserdampf in mit $CaSO_4$ beschickten Trockentürmen abgebunden wurde. Wasserfreies $CaSO_4$ erwies sich als ein ideales Trocknungsmittel, da es infolge seiner

gleichbleibenden Porosität auch im Inneren absorbiert, als Semihydrat (6,6 % Wassergehalt) einen Wasserdampfdruck von nur 0,004 Torr/ 25° C besitzt und bei Atmosphärendruck und 150 - 250° C leicht regenerierbar ist. FLOSDORF und MUDD wandten ihr Verfahren zwar vorwiegend zur Trocknung von Serum, Komplement, Protein, Enzymen usw. an, sie trockneten jedoch auch Bakterien und Viren. Sie hielten die Haltbarkeit bakterieller Präparate im Gegensatz zu konserviertem Virus für theoretisch unbegrenzt.

Die Vorteile des Manifoldprinzipes: kleiner Rezipient, daher Gewährleistung eines rasch einsetzenden, hohen Vakuums, welches bis zur endgültigen Gewinnung der Proben nicht zu unterbrochen werden braucht und daher eine absolute Sterilität garantiert, sowie kurze Trocknungszeiten sicherten in der Folgezeit seine starke Verbreitung. Über eine erfolgreiche Anwendung berichten HELLER, FRY und GRAEVES, STAMP, LESHINSKAJA, STEIN und ROGERS, KLÖNE, OELFKEN, JENDRUSCH, RHOADES u.v.a. LERCHE und ULBRICH (1950) und ULBRICH (1952) lyophilisierten nach diesem Verfahren Bang-Lebendimpfstoff. Sie arbeiteten mit einem zweistufigen Pumpensatz (Hg-Diffusionspumpe und rotierende Ölpumpe), der durch eine Kältefalle geschützt war und einem Glaskamm, an den die Ampullen an- und abgeschmolzen werden. Jede Ampulle wird durch einen besonderen Stutzen befüllt, der anschließend zugeschmolzen wird. Zum Einfrieren wird der Kamm in ein Brennspiritus-Trockeneisbad gestellt und verbleibt hier, bis ein Vorvakuum von mindestens 0,05 Torr erreicht ist. Dann wird das Kühlbad entfernt und bei Zimmertemperatur getrocknet. Es wurden Überlebensraten von 100 % erzielt, die auch nach 2jähriger Lagerung nicht vermindert waren.

Eine im Prinzip andersartige Konstruktion stammt von GRAEVES (1944). Sie besteht aus einer Vakuumkammer mit eingebauter Zentrifuge, deren Rotor die Ampullen in axialer Neigung aufnimmt. Die durch die Rotation freiwerdenden Zentrifugalkräfte verhindern ein Aufschäumen während des Evakuierens und drücken die Flüssigkeit bei vergrößerter Oberfläche an die Ampullenwand, so daß unter der Verdunstungskälte ein rasches Einfrieren erfolgt. Die weitere Trocknung verläuft dann bei abgeschalteter Zentrifuge. Der Wasserdampf wird innerhalb der Vakuumkammer entweder an Phosphorpentoxyd oder an Kühlschlangen niedergeschlagen. OELFKEN (1955) verglich das letztgenannte Verfahren mit der Methode von LERCHE und ULBRICH und konnte bei Pneumokokken, Pasteurellen und Rotlaufbakterien keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Überlebensraten feststellen. VAN DER SCHEER (1956) trocknete nach der GRAEVES'schen Technik Bang-Lebendimpfstoff und erzielte Überlebensraten von 88 %.

Der Effekt des Einfrierens infolge hoher Verdampfungsgeschwindigkeit, auf dem das besprochene Verfahren beruht, wurde erstmalig von ELSER, THOMAS und STEFFEN für Gefriertrocknungen beim sog. "snap-freezing" ausgenützt. Auch FLOSDORF und MUDD (1938) wandten es an und betonen die ausgesprochen gute Löslichkeit derart behandelter Proben, die der lege artis getrockneter überlegen ist. Ein Aufschäumen konnte durch langsames Einschleichen des Vakuums, das Entgasen, vermieden werden. Temperaturkontrollen in der Haupt-

trocknungsphase ergaben Durchschnittswerte von etwa -20° C. Es bewährte sich gut bei der Trocknung von Serum, schien aber ungeeignet für Bakterien und Viren und wurde daher in der Folgezeit vernachlässigt. Zu einem überraschenden Ergebnis kamen SCHMIDT und Mitarbeiter (1958), als sie in Parallelversuchen E. coli und Microc. pyogenes nach verschiedenen Gefriertrocknungsverfahren auf Überlebensraten hin prüften. Dabei zeigte es sich, daß ein bei Zimmertemperatur durchgeführtes "snap-freezing" mehrfach höhere Überlebensraten erbrachte, als Lyophilisation im Kältebad von -30° C. Man schloß hieraus auf eine Verminderung der bakteriellen Resistenz gegenüber Austrocknung nach vorausgegangenem Tiefgefrieren.

Die modernen Gefriertrocknungsanlagen arbeiten meist nach dem Kammerprinzip und sind mit elektrischen Messinstrumenten für Totaldruck- und Temperaturkontrollen ausgestattet. Durch Thermostaten gesteuerte Kühl- und Heizsysteme ermöglichen das Einstellen gewünschter Temperaturen im Trockengut. Der Wasserdampf wird entweder durch Gasballastpumpen direkt abgesaugt oder in Kompressorkühlfallen abgefroren. Die Nachtrocknung erfolgt mittels Öldiffusionspumpen, die ein Hochvakuum von weniger als 0,001 Torr erzeugen können. Nach beendeter Trocknung wird die Anlage geflutet, und die Ampullen werden am Trockenrechen erneut evakuiert und dann zugeschmolzen. Es ist auf diese Weise möglich, den Trocknungsprozeß den jeweiligen Ansprüchen des Materials anzupassen. Außerdem können größere Mengen in einem Arbeitsgang bewältigt werden.

2. Die Schutzlösung

Schon frühzeitig waren Bestrebungen im Gange, die Absterberaten während der Trockenkonservierung zu reduzieren. Dies geschah durch Neuentwicklung und Verbesserung der Apparatetypen sowie durch Anwendung von Suspensionsmedien, sog. Stabilisatoren, die die während des Trocknungsprozesses einwirkenden Noxen auf ein Mindestmaß beschränken sollen. Auf die günstige Wirkung eiweißhaltiger Medien wiesen als erste KITASATO (1889) und FICKER (1898) hin, die an Seidenfäden getrocknete Choleravibrionen wesentlich länger am Leben erhalten konnten als auf Glasscherben getrocknete. Später konservierte FICKER (1908) Choleravibrionen in verschiedenen Suspensionsmitteln und erhielt nachstehende Reihenfolge abnehmender Verträglichkeit: Milch, Bouillon, Serum; und in weitem Abstand Speichel, Leitungswasser, destilliertes Wasser, physiologische Kochsalzlösung, Urin. Hierbei zeigte sich erneut die günstige Wirkung eiweißhaltiger Substrate, die sich deutlich von dem rasch eintretenden Zelltod infolge osmotischer Schädigung bei Verwendung wässrig-mineralischer Lösungen unterschied. Eine quantitative Studie von OTTEN (1930) hatte die Beziehungen zwischen Suspensionsdichte und Überlebensrate bei Typhus-, Dysenterie- und Choleraerregern zum Gegenstand. Sie ließ bei erhöhten Dichten ein vermindertes Absterben erkennen, welches man auf die einhüllende Wirkung und den Kolloidschutz der abgestorbenen Keime sowie deren freigesetzter Proteine zurückführte. OTTEN

empfahl daher abgetötete Kulturen als Stabilisator. Zu gleichen Ergebnissen kamen RECORD und TAYLOR (1953) bei der Lyophilisation von Bact. coli. Sie machten für die Schutzwirkung jedoch ausschließlich die Exsudate der abgestorbenen Keime verantwortlich, da infolge der Zellfixierung im gefrorenen Zustand eine Annäherung benachbarter Zellen unmöglich erscheint. Diese Annahme konnte experimentell bewiesen werden. Als Ursache der protektiven Funktion der Exsudate, die nicht artspezifisch ist, wurde die Zellumhüllung und die Retention lebenswichtigen Spurenwassers angesehen. Blutstabilisiertes Material wurde von BROWN (1932) und LEIFSON (1936) getrocknet, während über die Verwendung von Serum erstmalig SWIFT (1921, 1937) berichtete. Einen weiteren Schritt zur Verbesserung der Stabilisatoren unternahm HELLER (1941), als er eine große Anzahl 1 %iger kristalloider und kolloidaler Lösungen als Adjuvantien für E. coli comm., Microc. pyog. und Strept. C 203 in Gefriertrocknungen testete. Als beste Schutzmittel erwiesen sich kombinierte Zucker-Eiweißlösungen. FRY und FRY und GRAEVES (1951) setzten ihre Versuche in dieser Richtung fort und konstatierten nach Experimenten mit Bact. paracoli einen optimalen Glukosezusatz von 7,5 % zu eiweißhaltigen Medien wie Serum, Milch, Albumin, Globulin oder Gelatine. Als beste Kombination erwies sich die "Mixtura desiccans", die aus einem Teil Nährgelatine und drei Teilen Serum mit 7,5 % Glukose bestand.

Untersuchungen über den Einfluß der Zuckerart wurden von HECKLY und Mitarbeitern (1960) bei Bruc. melitensis angestellt. Die in 6 %igen Saccharose-, Glukose- und Laktoselösungen getrockneten Bakterien waren, bei gleichen Ausgangsüberlebensraten von 50 %, nach 125tägiger Lagerung unterschiedlich vermindert: am stärksten die glukose- und laktosehaltigen Proben, am geringsten die saccharosehaltigen. Auf die Bedeutung eines ausgewogenen Kohlehydrat/Proteinverhältnisses im Stabilisator wiesen RECORD und TAYLOR (1960) hin. Sie räumen dem Zucker eine wichtige Schutzfunktion auf die Zellwand beim Trocknen ein, halten aber eiweißfreie Zuckerlösungen für schädlich. Sie konnten nämlich feststellen, daß Zuckermoleküle in das zwischen Plasmamembran und äußerer Zellschicht gelegene Interstitium der Zellwand eindringen können, hier z. B. bei der Wiederbewässerung osmotisch wirksam werden und vakuoläre Schädigungen hervorrufen. Setzte man Zuckerlösungen Protein zu, so beobachtete man eine Kontraktion der Zellmembran, die eine Verengerung des intramuralen Interstitiums zur Folge hatte, das Eindringen niedermolekularer Substanzen reduzierte und die Vitalkeimverluste verringerte.

In der jüngsten Zeit fanden häufig reduzierend wirkende Stoffe als Stabilisatorzusätze Verwendung. NAYLOR und SMITH (1946) und STAMP (1947) versahen verschiedene Grundmedien mit 0,1 - 0,5 % Ascorbinsäure als Oxydationsschutz und registrierten verminderte Lagerungsverluste. Genaue Untersuchungen über die Wirkungsweise von Reduktionsmitteln in der Schutzlösung wurden von VAN DER SCHEER (1956) an Bang-Lebendimpfstoff vorgenommen. Er konnte demonstrieren, daß diese Stoffe bereits während der Trocknung eine Schutzwirkung besitzen. Wurden Mittel wie Thioharnstoff und Ascorbinsäure weggelassen oder oxydativ abgesättigt verwendet, so ging die Überlebensrate von 70 bis 80 % auf etwa 50 % zurück. Ein hohes Redoxpotential im

Trocknungsgut war also ausgesprochen günstig. Schließlich konnte er die Trocknungsverluste auf 12 % senken, als er das 2 %ige Tryptose-Basismedium mit 0,5 % Ascorbinsäure und 0,75 % Thioharnstoff versetzte.

Während der Lagerung kann es in den Trockenpräparaten zu chemischen Umsetzungen kommen, die als das sog. "browning" die Vitalkeimzahlen erheblich senken. SCOTT (1960) führt dies auf aldehyd- und ketogruppenhaltige Substanzen zurück, die in Reaktion mit Proteinseitenketten treten, als deren Folge toxische Verbindungen freigesetzt und die Zellproteine denaturiert werden. Er bewies das, indem er 1/10 M Schutzlösungen von Pyruvat, Paraldehyd, Diazethyl und Ribose durch verwandte, höherwertige Alkohole ersetzte und den Lebendkeimverlust erheblich einschränkte. Weiterhin prüfte er aldehydinaktivierende Verbindungen wie Semicarbacid und Hydroxylamin in 1/100 M Lösungen und erreichte einen stabilen Lagerungsschutz. MUGGLETON (1960) empfiehlt als karbonylfixierende Substanzen nichtreduzierende Zucker, Polyole, Inositol und Glutaminsäure. GRAEVES (1960) untersuchte die Wirkung einiger Stabilisatoren auf die Hitzeresistenz gefriergetrockneten Paracolon D 201 H durch Eintauchen der Ampullen in kochendes Wasser. Die zuckerstabilisierten Proben waren wegen ihrer relativ hohen Wasserretention besonders browninggefährdet und deshalb außerordentlich hitzeempfindlich. Ein Zusatz von 5 % Natriumglutamat setzte die Widerstandsfähigkeit beträchtlich herauf.

3. Das Einfrieren und die Trocknungstemperatur

Bakteriensuspensionen sind komplexe Lösungssysteme, die während des Einfrierprozesses bestimmten physikalischen Gesetzen unterliegen (REY 1954, LYET 1960). Ihr wässrig-mineralischer Bestandteil bedingt Gefrierpunktserniedrigungen, die durch eine eutektische Zone mit einem maximalen Tiefpunkt, dem Eutektikum der Lösung, gekennzeichnet sind. Die organischen Bestandteile sind je nach Dispersionsgrad entweder auch eutektisch wirksam oder hemmen die Kristallisationsgeschwindigkeit des Eises. Außerdem können sie, besonders bei starkem Unterkühlungseffekt, glasartig erstarren und weisen dann große Härte und eine geringe, vom übrigen Trocknungsgut abweichende, spezifische Wärme auf. Durch vorsichtiges Erwärmen sind diese Strukturen, die einen Wasserentzug erschweren, rekristallisierbar. Ein rasches Tiefgefrieren ist mit einem starken Unterkühlungseffekt verbunden, als dessen Folge schlagartig eine Ausbildung feiner Eiskristalle oder deren Vorstufen ("amorphes" Eis, aus hexagonalen Kristallisationskernen und ungeordneten Kristalliten bestehend) eintritt. Bei verlangsamtem Einfrieren hingegen ordnen sich die Wassermoleküle zu größeren Kristalleinheiten, die bei allmählichem Wachstum dem noch flüssig gebliebenen eutektischen Milieu Wasser entziehen und einen deletären Anstieg der Elektrolytkonzentration in der noch flüssigen Phase verursachen können. Hinzu tritt die Gefahr mechanischer Zelläsionen durch die gröberen Kristalle. Aufgrund dieser Erscheinungen halten LYET und REY folgende Einfrierbehandlung für optimal:

a) Sturzkühlung auf Temperaturbereiche unterhalb des Eutektikums. (Für biologische Systeme wird allgemein $CaCl_2$ mit -54,9° C als unterste Grenze angesehen).

b) Vorsichtiges Rückerwärmen zum Devitrifikationspunkt, an dem die glasigen Strukturen auskristallisieren können (Devitrifikationspunkt von Gelatine -10°, von Glyzerin -65° C).

c) Rückkühlen auf eine möglichst niedrige Trocknungstemperatur.

Zu widersprüchlichen Ergebnissen kamen WEISER und OSTERUD (1946), die E. coli-Suspensionen in N_2-Dampf der Kristallisation unterwarfen und nach Auftauen Überlebensraten von 82,75 % erhielten. Wurden die Proben hingegen in flüssigem N_2 bei -195° C verglast und anschließend der Devitrifikation durch langsames Auftauenlassen unterzogen, so verminderte sich die Überlebensquote auf 33 %.

Das feinkristalline oder nur Kristallisationskerne enthaltende amorphe Eis sublimiert nach NEUMANN (1952) langsamer im Vakuum als das aus größeren Kristalleinheiten bestehende.

Besonders bei längerem Gefrorenbleiben von Bakterien ist ein kritischer Temperaturbereich zu vermeiden, der erhebliche Noxen auf das Material ausübt. SIZER und JOSEPHSON (1942) konnten nachweisen, daß die Fermentaktivität bei fallender Gefriertemperatur stufenweise erlischt, so z. B. die Invertasewirkung bei -18° C und die Lipasewirkung bei -24,5° C. Bei ungenügenden Temperaturen kann auf diese Weise eine enzymatische Reaktionskette unterbrochen werden, was eine unphysiologische und daher toxische Anhäufung von jenen Stoffwechselprodukten bedingt, deren substratspezifische Fermente bereits inaktiviert sind. HAINES (1938) gibt als kritisches Temperaturbereich für Ps. aeruginosa 0° - -20° C an und konnte bei -2° C eine Kältekoagulation bakterieller Proteine nachweisen. Für E. coli sind Temperaturen oberhalb - 30° C schädlich (WEISER und OSTERUD 1945, PROOM 1951). Die AMERICAN CYANAMID COMPANY (1959) lagert ihre Testkeime für Vitamin- und Tetracyclinstandardisierungen tiefgefroren bei -40° C erfolgreich länger als ein Jahr.

STILLE (1950) konnte bei einer Reihe von Bakterien nach Auftauversuchen stark erhöhte Überlebensraten ab -24° C feststellen, die bei weiterer Temperatursenkung bis -193° C fortlaufend anstiegen. Vergrößerte Absterbequoten waren in Lösungen niedrigen pH-Wertes und hohen Elektrolytgehaltes zu beobachten. Am schonendsten erwies sich schnelles Einfrieren und langsames Auftauen. Gegenteiliger Auffassung ist MAZUR (1960), der Past. tularense einer Vielzahl variierter Einfrier- und Auftaumodi unterzog. Dabei erwies sich in allen Fällen ein langsames Einfrieren und rasches Auftauen als am vorteilhaftesten. Die Extreme der Überlebensraten nach unterschiedlicher Einfriergeschwindigkeit betrugen 90 und 20 %. Die Überlegenheit des langsamen Einfrierens begründet er wie folgt: Durch extrazelluläre Eisbildung wird aus den Bakterienzellen Wasser gesogen, die, daran verarmt, vor den Noxen intrazellulären Kristallwachstums geschützt sind. Die

Uneinheitlichkeit der Meinungen zu diesem Problem spiegelt sich in den Arbeiten von TOKIO NEI (1960) wider. Langsam eingefrorene Proben von Sacch. cerevisiae und Bact. megatherium wurden durch die osmotische Wirkung des extrazellulären Eises deformiert oder erlitten Zellwandzerstörungen, die zu Achromasie und "Ghostformen" führten. Die nach raschem Einfrieren einsetzende intrazelluläre Eisbildung hingegen blieb ohne Einfluß auf die Morphologie der Zellen. Nach Inkubation war die physiologische Aktivität der letztgenannten Proben, gemessen am Umfang der Assimilation radiomarkierten Phosphors, von Beginn an in voller Höhe ausgeprägt, während sie bei den ersteren nur allmählich wieder anstieg.

HÖRTER (1958) prüfte den Einfluß der Einfriergeschwindigkeit auf die Lebendkeimverluste nach der Gefriertrocknung an 32 Bakterienarten. Der Gesamtdurchschnitt aller Überlebensraten nach langsamem Einfrieren betrug 60,87 %, der nach schnellem Einfrieren nur 47,8 %. Bei allen Keimen war mehr oder weniger das langsame Einfrieren überlegen, lediglich die Salmonellen vertrugen beide Methoden etwa gleich gut. Als er in einem Nebenversuch das Schutzmedium von Bruc. abortus austauschte und anstelle von Magermilch in der Mixtura desiccans nach FRY lyophilisierte, wirkte sich nunmehr die schnelle Einfriermethode günstiger aus. Er empfiehlt daher, das zu benutzende Einfrierverfahren der Keimart und der Schutzlösung anzupassen. SCHMIDT und Mitarbeiter (1958) prüften den Einfluß beider Einfrierverfahren auf das Überleben von E. coli und Microc. pyogenes nach Gefriertrocknung und fanden etwa 10fach höhere Lebendkeimzahlen nach langsamem Einfrieren.

Während der Trocknung soll das Material auf Temperaturen eingestellt werden, die möglichst unterhalb des kritischen Bereiches liegen. HUTTON und HILMOE (1951) demonstrierten an Bruc. abortus die unterschiedliche Verträglichkeit einzelner Trocknungstemperaturen. Bei -10° überlebten 1 - 10 %, bei -15° 6 - 57 %, bei -20° 39 - 59 % und bei -25° C 44 - 62 % aller Keime die Trocknung. Gleichbleibende und hohe Überlegensraten waren also nur von -20° C an zu erzielen. VOSS (1959) lyophilisierte mehrere Diphtheriestämme und Shigella flexneri bei -20°, -40° und -60° C und fand in allen Fällen bei -40° stärker an die Ausgangskeimzahl angenäherte Werte als bei -20° C. In vier von sechs Fällen lagen die Maxima bei -60° C. MUGGLETON (1960) unternahm gleichartige Versuche mit B. C. G. Impfstoff und konnte die Überlebensarten bei fallenden Temperaturen (-10° - -31° C) von 7,8 % auf 51 % steigern. Der kritische Bereich lag zwischen -25° und -28° C, wo ein Vitalkeimsprung von 12,5 % auf 45 % erfolgte.

Über abweichende Erfahrungen berichteten HECKLY und Mitarbeiter (1960), die Bruc. melitensis bei -18° und -28° C trockneten. Sie fanden in beiden Chargen unmittelbar nach Trocknungsabschluß gleiche Überlebensraten, doch waren die bei -28° C getrockneten Proben weniger lagerungsstabil. SCHMIDT und Mitarbeiter (1958) konservierten E. coli und Microc. pyogenes vergleichend im normalen Gefriertrocknungsverfahren und nach dem Snap-freezing-Prinzip und stellten ein erheblich besseres Abschneiden der zweiten Methode fest, obwohl sie hierbei das Trocknungsgut nicht kühlten.

4. Trocknungsdauer und Restfeuchtigkeit

Die Haltbarkeit gefriergetrockneter Bakterien ist in entscheidendem Maße von ihrem Wassergehalt, der sog. Restfeuchtigkeit, abhängig. Auf ihre Bedeutung wies bereits ROGERS (1914) hin, der Trockenkulturen von Milchsäurebakterien durch Nachtrocknung bzw. Wasseraufnahme auf Restfeuchten von 1 % und 5 - 6 % einstellte und in den wasserärmeren Proben wesentlich höhere Überlebensraten feststellen konnte. Die Schädlichkeit eines zu weitgehenden Wasserentzuges konnten FRY und GREAVES (1951) demonstrieren, die nach verlängerter Trocknung erniedrigte Überlebensraten fanden. Die günstige Wirkung von Zuckerzusätzen zum Stabilisator führten sie auf die verstärkte Wasserretention der Saccharide zurück, die die Gefahr einer Übertrocknung fernhalten.

Da die Trockungsdauer eine Exponentialfunktion des Feuchtigkeitsgehaltes ist (KLÖNE 1951), kann auch nach langem Evakuieren nicht alle Restfeuchtigkeit entfernt werden. FRY und GREAVES (1951) und B. SCHMIDT (1958) verfolgten den Lebendkeimrückgang während des Trocknungsprozesses und sahen den stärksten Abfall in der Haupttrocknungsphase und einen weiteren, stetigen Abfall bei verlängerter Trocknung. Während frühzeitig dem Trocknungsprozeß entnommene Proben zwar größere Lebendkeimzahlen aufweisen, infolge des noch relativ hohen Restwassergehaltes aber wenig lagerungsstabil sind (VERWEY und Mitarbeiter 1951), tritt bei übertrocknetem Bakterienmaterial Tod durch Desiccation ein (HEWITT 1950). Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, daß das Trockengut für eine optimale Haltbarkeit eine Restfeuchte braucht, die nach Möglichkeit nicht über- und unterschritten werden sollte.

Die optimalen Restfeuchtigkeitswerte für Bakterien sind noch nicht genau festgelegt. HUTTON und HILMOE und VERWEY geben für Bruc. abortus RF-Werte von 0,2 - 1,0 % an; FLOSDORF und MUDD fordern mindestens 1 %, während HARRIS (1954) für Werte über 1 % plädiert.

OBAYASHI (1960) setzte sich mit den Beziehungen zwischen Schutzlösung und erreichbarer Restfeuchtigkeit auseinander. Er versetzte B. C. G. -Vakzine bei sonst gleichen Versuchsbedingungen mit steigenden Konzentrationen von Natriumglutamat und stellte nach der Lyophilisation jeweils erhöhte Restwassermengen fest. Ein analoger Vergleich von Serum, Magermilch, Glukose und physiologischer Kochsalzlösung erbrachte keinen Anhaltspunkt unterschiedlicher Wasserretention (SCHMIDT 1957).

STAMP (1947) bestimmte die Sublimationsraten nach Trocknung aus flüssiger Phase und Gefriertrocknung und fand den Wasserentzug bei letzterem Verfahren mit 90,1 % gegen 89,4 % etwas erhöht.

5. Die Lagerung

Bakterielle Trockenpräparate unterliegen während der Lagerung einer stetigen Lebendkeimverminderung, deren Ausmaß von verschiedenen

Faktoren bestimmt wird. Als solche wurden neben der Restfeuchtigkeit und der Schutzlösung, auf die bereits eingegangen worden ist, der Empfindlichkeitsgrad der Bakterienart, die Lagerungstemperatur, die Beschaffenheit der Gasatmosphäre über dem Trockengut und der Lichtzutritt erkannt.

Die unterschiedliche Empfindlichkeit mehrerer Keimarten nach längerer Lagerung kam in quantitativen Untersuchungen von SCHMIDT (1957) und HÖRTER (1960) zum Ausdruck. SCHMIDT verzeichnete starke Verluste nach 5 - 18monatiger Lagerung bei Brucellen und Pasteurellen, während der Keimrückgang bei Salmonellen und Kolibakterien relativ gering war. HÖRTER fand nach laufenden Kontrollen über 2 Jahre Mikrokokken, Listerien, Serratia marcescens und Salmonellen nicht oder nur unwesentlich vermindert, während Bruc. abortus nach 6monatiger Lagerung etwa 50 % seiner ursprünglichen Überlebensrate eingebüßt hatte, auf dieser Höhe aber konstant blieb.

Nach VAN DRIMMELEN und STEYN (1958) sinkt die Überlebensrate bei Bang-Lebendimpfstoff logarithmisch in Abhängigkeit von der Wochenzahl ab. Setzt man einen logarithmischen Abfall voraus, so ist es erklärlich, daß auch nach sehr langer Lagerung noch Lebendkeime vorgefunden werden. Dies bestätigten für Trocknungen aus flüssiger Phase BROWN, HEIM, LEIFSON, STAMP, HARRIS und LANGE und für Gefriertrocknungen SWIFT, MORTON und PULASKI (1938), PROOM und HEMMONS (1949), RHOADES (1958) u. v. a.

Auf den schädlichen Einfluß erhöhter Lagerungstemperaturen wies bereits ROGERS (1914) hin, der Milchsäurebakterien bei Temperaturen zwischen - 6° und +37° C lagerte und deutlich höhere Überlebensraten bei -6° fand. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen WEISER und HENNUM (1947) bei E. coli, die einen 50 %igen Lagerungstod nach 10 Tagen bei Zimmertemperatur, aber erst nach 40 Tagen bei Kühlschranktemperatur feststellten. Untersuchungen HECKLY's ergaben, daß lyophilisierte Bruc. melitensis-Kulturen eine 100tägige Lagerung ohne signifikante Verluste bei 0° C vertragen, während sich bei 20° und 38° C ein Lebendkeimsturz von 3 bzw. 6 Zehnerpotenzen einstellte. Nach LERCHE und ULBRICH hingegen wird die Lagerungsstabilität bei Zimmertemperatur nicht beeinträchtigt. Es soll jedoch tunlichst im Dunkeln aufbewahrt werden, um eine Schädigung durch direktes Tageslicht zu vermeiden. Auch NEUMANN ist der Meinung, daß sich höhere Lagerungstemperaturen nur dann schädlich auswirken können, wenn das Material ungenügend getrocknet ist, eine Ansicht, die auch SCOTT teilt.

Über den Einfluß der Gasatmosphäre auf das Trockengut wurde experimentell von ROGERS, TAYLOR und SMITH (1946) und PROOM gearbeitet. Die höchsten Überlebensraten wurden nach Vakuumlagerung gefunden, dann folgte Stickstoff, während chemisch reaktive Gasarten wie Kohlendioxyd und Sauerstoff oder Luft erhebliche Absterbequoten hervorriefen. Eingesprungene Ampullen oder durch Gummistopfen unzureichend verschlossene Röhrchen, die ursprünglich unter Vakuum standen, verlieren nach Eindringen von Luft auffallend schnell ihre lebenden Bakterien (ULBRICH, HECKLY). NEUMANN hält es für wahrscheinlich, daß die Noxe nicht von der Luft, sondern von dem miteingedrungenen Wasserdampf ausgeht.

Um die Mortalität bei der Wiederbewässerung und Resuspension der Trockenpräparate einzuschränken, empfehlen LEACH u. SCOTT (1959), zu Beginn möglichst kleine Wasservolumina zu verwenden und sie nicht auf einmal, sondern langsam und tropfenweise zuzusetzen.

III. Eigene Versuche

1. Material:

Die nachstehenden Versuche wurden mit folgenden Bakterienstämmen durchgeführt:

Brucella abortus St. Buck 19
Salmonella abortus ovis

Die Brucellen wurden auf Glyzerin-Kartoffelschrägagar in Lüerschen Röhrchen bei 37° C gezüchtet, nach 48 stündiger Bebrütung mit destilliertem Wasser abgeschwemmt und am Kolorimeter nach Dr. Lange, Berlin, auf eine Dichte von 12 Mrd./ml eingestellt. Das Gerät war in Vorversuchen, unter Zuhilfenahme des Koch'schen Plattenverfahrens, auf Buck 19-Lebendkeimdichten zwischen O und 20 Mrd./ml geeicht worden.

Als Schutzlösung diente sterilisierte Magermilch, die zuvor 30 Minuten bei 100° C erhitzt worden war. Sie wurde der Brucellensuspension im Verhältnis 1 : 1 zugesetzt, so daß im Gebrauchsmedium 6 Mrd. Keime/ml vorlagen. Der pH-Wert lag bei 6,8. Das Material wurde anschließend in 0,2 ml-Portionen auf 110 Ampullen verteilt, die bis zum jeweiligen Versuchstag, mit Wattestopfen versehen, bei +4° C gelagert wurden.

Die Züchtung der Salmonellen erfolgte auf Albimischrägagar in Lüerschen Röhrchen. 48 stündige Kulturen wurden mit destilliertem Wasser abgeschwemmt und kolorimetrisch auf eine Lebendkeimdichte von 3,3 Mrd./ml eingestellt, der ein Extinktionswert von 2,1 entsprach. Anschließend wurden als Kolloidschutz gleiche Volumina sterilisierter Magermilch hinzugefügt, so daß die gebrauchsfertigen Suspensionen 1,65 Mrd. lebende Keime/ml besaßen. Das Befüllen der Ampullen und die Lagerung bis zum Versuchstag geschah in der bereits beschriebenen Weise.

2. Methodik

Das Material wurde verschiedenen Trocknungs- und Gefriertrocknungsverfahren unterworfen. Die Dauer jedes Versuches betrug 8 Stunden. Von Versuchsbeginn an wurden nach 1/2 und dann jeweils nach einer vollen Stunde Trocknungsdauer je zwei Ampullen abgeschmolzen, von denen eine am gleichen Tag, die andere nach mindestens 6 monatiger Lagerung bei Kühlschranktemperatur auf Überlebensraten hin geprüft wurden. Durch diese Methodik sollte der Lebendkeimverlust während des Konservierungsprozesses genau verfolgt und die Lagerungsstabilität der in unterschiedlichen Trocknungsphasen entnommenen Proben kontrolliert werden.

Es wurde nach der FLOSDORF-MUDD'schen Technik gearbeitet. Zur Verfügung stand ein Trockenrechen aus Glas mit 20 Evakuierungsstutzen, an welche die Ampullen mittels kurzer Gummistücke aus dickwandigem Vakuumschlauch aufgesteckt wurden. Am Horizontalarm des Trockenrechens war ein verkürztes Quecksilbermanometer aufmontiert, um etwaige, während des Trocknungsprozesses auftretende Leckstellen sofort erkennen zu können. Zur Pumpe hin konnte der Rechen durch einen Glashahn abgesperrt werden. Die Verbindung Pumpe - Trockenrechen bestand aus großkalibrigem Vakuumschlauch (lichte Weite 7 mm), in die eine Kältefalle zwischengeschaltet war. Diese wies rechenseitig ein Ansatzstück für den McLeod auf, der zur Bestimmung des Feinvakuums Verwendung fand. Es konnten Drucke permanenter Gase bis 0,001 Torr erfaßt werden. Die Kältefalle tauchte in ein Dewargefäß, welches mit einer sirupösen Spiritus- CO_2-Eismischung von -78^{o} C beschickt war. Die mit einer dicken Schicht Polsterwatte abgedeckten Gefäße hielten die Temperatur, auch im Sommer, mindestens 8 Stunden lang.

Die engsten Stellen, die der Wasserdampf während der Evakuierung passieren mußte, hatten ein Lumen von 6 mm. Es waren die Ampullenhälse und die Evakuierungsstutzen am Glasrechen.

Als Pumpenaggregat diente eine einstufige Ölrotationspumpe vom Typ Pfeiffer 1800, die bei einer Saugleistung von 2,5 m^3 pro Stunde ein Endvakuum von 0,001 Torr erreichte. Für die Trocknungen ohne Kältefalle mußte eine Pumpe herangezogen werden, die, ohne Schaden zu nehmen, Wasserdampf ansaugen und ausstoßen konnte. Diesen Zweck erfüllte die einstufige Rotationspumpe Leybold D5, die mit einer Gasballasteinrichtung nach Gaede versehen war. Sie hatte eine Förderleistung von 5 m^3 pro Stunde und unter Gasballast ein Endvakuum von 0,01 bis 0,02 Torr.

Für Temperaturmessungen wurde das geeichte thermoelektrische Meßinstrument des Gefriertrocknungsapparates GO 2 der Firma Leybold verwendet. Der Temperaturrezeptor tauchte in das Trockengut; die beiden ableitenden Kabel wurden innerhalb des Ampullenhalses bis zu der Gummimanschette am Evakuierungsstutzen geführt, von wo sie durch zwei feine Bohrkanäle, die mit Injektionskanälen gesetzt worden waren, weitergeleitet und an die Kontakte des Meßinstrumentes angeschlossen werden konnten. Die Bohrstellen waren von außen zusätzlich mit Plastelin abgedichtet, so daß keine Beeinträchtigung des Vakuums auftrat.

Die Keimsuspensionen wurden folgenden 5 Trocknungs- und Gefriertrocknungsverfahren unterzogen:

a) Lyophilisation nach dem Snap-freezing-Prinzip, das auf dem Eingefrieren des Materials unter dem Einfluß des Wärmeentzuges bei schneller Verdampfung beruht.

Die Ampullen wurden am Trockenrechen befestigt, der über eine Kältefalle mit der Pumpe verbunden war. Nachdem sich ein ausreichendes Vorvakuum von mindestens 0,022 Torr eingestellt hatte, wurde die Flüssigkeit zunächst durch vorsichtiges Öffnen und Schließen des Hahnes am Rezipienten entgast. Erfahrungsgemäß bildeten sich nach 4 minü-

tiger Regulierung keine Gasblasen mehr, so daß der Hahn voll geöffnet werden konnte. Unter dem Einfluß des hohen Vakuums, welches rasch auf Werte bis 0,005 Torr abfiel, froren die Proben nach etwa 2 Minuten schlagartig ein, erkennbar an einem plötzlichen Transparenzverlust der Objekte. Bald nach dem Einfrieren wölbte sich ein feines, pergamentähnliches Häutchen kuppenartig über das Trockengut, welches danach makroskopisch unverändert blieb. Bereits nach 1/2stündiger Trocknung war die Hauptwassermenge entfernt und der Ampulleninhalt nicht mehr auftaubar. Das Trockengut dieser Charge war besonders leicht löslich.

b) Gefriertrocknung mit Kältefalle nach vorheriger Sturzkühlung der Proben im Spiritus-CO_2-Eisbad auf -78° C.

Die am Trockenrechen befestigten Ampullen wurden durch Eintauchen in das Kältebad eingefroren. Wenn das Vorvakuum auf mindestens 0,022 Torr abgesunken war, wurde mit der Trocknung begonnen und der Hahn zum Rezipienten geöffnet. Nach weiteren 10 Minuten wurde die Kühlwanne entfernt und bei Zimmertemperatur weitergetrocknet. Das weiß gefärbte Material war nach 1 Stunde noch auftaubar und nahm bei fortschreitender Trocknung eine immer porösere Beschaffenheit an, die zum Zerbröckeln neigte.

c) Gefriertrocknung mit Kältefalle nach langsamem Einfrieren auf -40° C.

Die dem Kühlschrank entnommenen Ampullen wurden am Trockenrechen aufgesteckt und in eine Kühlwanne mit Spiritus von -5° C eingetaucht. Durch langsame Zugabe von Trockeneis sank die Temperatur innerhalb 1 Stunde gleichmäßig auf -40° C ab. Das Material fror, unabhängig von der verwendeten Keimart, stets bei -10° C ein. Die Kühlwanne wurde 10 Minuten nach Trocknungsbeginn entfernt. Bereits nach 1 stündiger Trocknung konnten die Proben nicht mehr verflüssigt werden. Von diesem Zeitpunkt an löste sich das Material, ohne seine Kompaktheit zu verlieren, von der Ampullenwand ab.

d) Trocknung aus flüssiger Phase mit Gasballastpumpe ohne Kältefalle.

Der Rezipient wurde zunächst stufenweise evakuiert, um ein Entgasen der Flüssigkeit herbeizuführen. Danach konnte das Trocknungsgut, ohne aufzuschäumen oder einzugefrieren, der vollen Saugleistung der Pumpe ausgesetzt werden. Während bei den Lyophilisationen das Originalvolumen des Ampulleninhaltes erhalten blieb, trocknete hierbei das Material zu einer farblosen, amorphen Schicht hoher Transparenz ein. Nach 1 stündiger Trocknung hatte es die flüssige Konsistenz verloren. Nach Ablauf von 3 Stunden waren im Trockengut feine, radiär verlaufende Sprünge zu beobachten.

e) Schnelltrocknung aus flüssiger Phase im Wärmebad mit Kältefalle.

Die am Trockenrechen befestigten Ampullen wurden in ein Durchlaufwärmebad von 37° C getaucht und entgasten partiell nach Temperatur-

ausgleich. Das im Pumpenvorlauf erzeugte Vorvakuum wurde zunächst allmählich auf den Rezipienten ausgedehnt und entfernte die letzten gelösten Gase. Anschließend wurde der Hahn am Rechen voll geöffnet. Das Wärmebad konnte bereits 5 Minuten nach Trocknungsbeginn weggehoben werden, da das Material zu dieser Zeit schon grobsinnlich wasserfrei erschien. Morphologisch stimmte es mit dem homogenen Trokkengut der zuletzt beschriebenen Methode nicht überein; es überzog den Ampullengrund in dünner Schicht und war mit winzigen Bläschen durchsetzt.

Zum Abschmelzen der Ampullen unter Beibehaltung des Originalvakuums fand ein einflammiger Gebläsebrenner Verwendung. Sämtliche gewonnenen Ampullen wurden am Versuchstag und nach beendeter Lagerung mit einem Hochfrequenzvakuoskop auf Undichtigkeiten geprüft.

Die Bestimmung der Keimzahlen erfolgte nach dem Koch'schen Plattenverfahren. Es wurden Zählungen vor Trocknungsbeginn, während der Trocknung und nach Lagerungsabschluß vorgenommen. Die Bakteriensuspensionen wurden je nach Originaldichte verschiedengradig in 0,85 %iger Kochsalzlösung verdünnt und in der Enddilution auf vorgetrocknete Albimiagarplatten gebracht und hier ausgespatelt. Der Keimgehalt jeder Probe wurde aus dem arithmetischen Mittel der Koloniezahl auf 4 Agarplatten berechnet. Die Ampullen wurden zum Öffnen erst zirkulär angesägt und daraufhin mit einem glühendgemachten Glasstab an der Schnittspur zum Einspringen gebracht. Nach Druckausgleich konnten die Ampullen gefahrlos geöffnet werden, ohne daß ihr Inhalt durch einen stoßartigen Lufteinbruch im Raum versprayt wurde.

Bei der Keimbestimmung der brucellenhaltigen Proben wurde zunächst der Ampulleninhalt in 2 ml Wasser aufgenommen. Da sich ursprünglich in jeder Ampulle 0,2 ml der Originalsuspension befunden hatte, ergibt sich eine Grundverdünnung von 1 : 10. Von dieser Aufschwemmung wurde 1 ml entnommen und in drei Hunderterstufen weiterverdünnt. Schließlich gelangte 0,1 ml auf jede Zählplatte, so daß der Gesamtverdünnungsfaktor 10^8 betrug. So ensprach z. B. ein arithmetisches Mittel von 10 Kolonien einer Lebendkeimdichte von 1 Mrd./ml, bezogen auf die vor Versuchsbeginn hergestellte Originalsuspension. Bei Proben mit zu erwartenden hohen Lagerungsverlusten, wurde die Technik modifiziert und zusätzliche Plattentests nach Verdünnungen von $1 : 10^6$ und $1 : 5 \cdot 10^7$ durchgeführt. Die beimpften Platten wurden 4 Tage lang bei 37° C bebrütet und waren danach mit stecknadelkopfgroßen, tautropfenartigen Brucellakolonien bewachsen. Die Bakterien gelagerter Proben wuchsen erheblich langsamer an und mußten 7 Tage inkubiert werden.

Die salmonellahaltigen Proben wurden ebenfalls in 2 ml Wasser aufgenommen, dann jedoch in zwei Hunderter- und einer Zehnerstufe weiterverdünnt. Anschließend wurden je 0,1 ml der Enddilution auf 4 Agarplatten verbracht und ausgespatelt. Der Verdünnungsfaktor betrug hier 10^7, so daß z. B. 100 Kolonien pro Zählplatte einer Keimdichte von 1 Mrd./ml entsprachen. Bei der Untersuchung gelagerten Proben wurden je nach Verdacht Dilutionen von $1 : 10^5$ oder $1 : 10^6$ mituntersucht. Eine Inkubation von 2 Tagen war in allen Fällen, also auch bei gelagertem Material, ausreichend. Die etwa reiskorngroßen, runden

Kolonien waren farblos und wenig erhaben.

Die Bestimmung der Restfeuchtigkeit erfolgte auf gravimetrischem Wege, indem die Trockenpräparate einer mehrtägigen, extremen Nachtrocknung bis zur Gewichtskonstanz unterzogen wurden. Da die Restfeuchtigkeit den prozentualen Anteil des Spurenwassers am Gewicht des Trockengutes ausdrückt, mußten die beiden letztgenannten Größen möglichst genau ermittelt werden. Zur Verfügung stand eine Analysenwaage mit einer Meßgenauigkeit bis zu 10^{-5} g, auf der zunächst das Leergewicht der Ampullen und später das Bruttogewicht nach der Trockenkonservierung bestimmt wurde. Die Differenz beider Wägungen entsprach dem Gewicht des Trockengutes. Anschließend wurden die Ampullen in einen $CaCl_2$-Exsikkator verbracht und hier bei 10^{-2} Torr und Zimmertemperatur bis zur Gewichtskonstanz nachgetrocknet. Dabei verminderte sich das Bruttogewicht um den Betrag des Restwassers. Laufende Kontrollwägungen, die während der Nachtrocknung stattfanden, ließen vom 4. Tage an keinen weiteren Gewichtsrückgang erkennen. Um abgesicherte Ergebnisse zu erhalten, wurden die Proben 3 Tage länger im Exsikkator belassen und erst dann endgültig abgewogen. Da das Trokkengut außerordentlich hygroskopisch war, hätte sich ein Zutritt der feuchten Außenluft störend bemerkbar gemacht. Aus diesem Grunde wurde der Exsikkator zum Öffnen in einen trockenluftbeheizten Brutraum gebracht und hier über eine $CaCl_2$-Patrone geflutet. Unmittelbar nach Abnahme des Deckels wurden die Ampullen mit festschließenden Gummistopfen versehen, die nur für die kurze Zeit des Abwiegens entfernt wurden.

Orientierende Vorversuche dienten dem Vertrautwerden mit der Technik und der Suche nach einem geeigneten Stabilisator, da bei Trocknungen in destilliertem Wasser 96 % aller Brucellen abstarben. Bei Verwendung inaktivierten Pferde- oder Rinderserums, die in 50 %igen Lösungen benutzt wurden, war die Löslichkeit unbefriedigend, besonders nach Trocknungen aus flüssiger Phase. Erst die Anwendung von Magermilch als Schutzlösung brachte zufriedenstellende Ergebnisse, sowohl in bezug auf die Überlebensraten wie die Resuspendierbarkeit. Die Trockenpräparate aller Chargen waren nunmehr gleich gut löslich, lediglich die nach dem Snap-freezing-Prinzip gewonnenen Präparate zeigten sich den anderen etwas überlegen.

3. Versuchsergebnisse

In den folgenden Tabellen sind die Zahlen der überlebenden Keime zusammengefaßt, die während der Trocknung und nach Lagerungsabschluß vorgefunden wurden. Von jeder Charge wurden im Verlauf des Konservierungsprozesses in den angegebenen Zeitabständen je zwei Proben entnommen, die am Versuchstag und nach mehrmonatiger Lagerung ausgezählt wurden. Beide Ergebnisse stehen in der Tabelle nebeneinander und sind der besseren Übersichtlichkeit wegen graphisch dargestellt. Ihr Größenunterschied entspricht der lagerungsbedingten Absterbequote, die prozentual erfaßt worden ist. Da sich eine Streuung

der in den Versuchen gewonnenen Daten um Idealwerte nicht vermeiden ließ, mußten gewisse Diskontinuitäten in Kauf genommen werden.

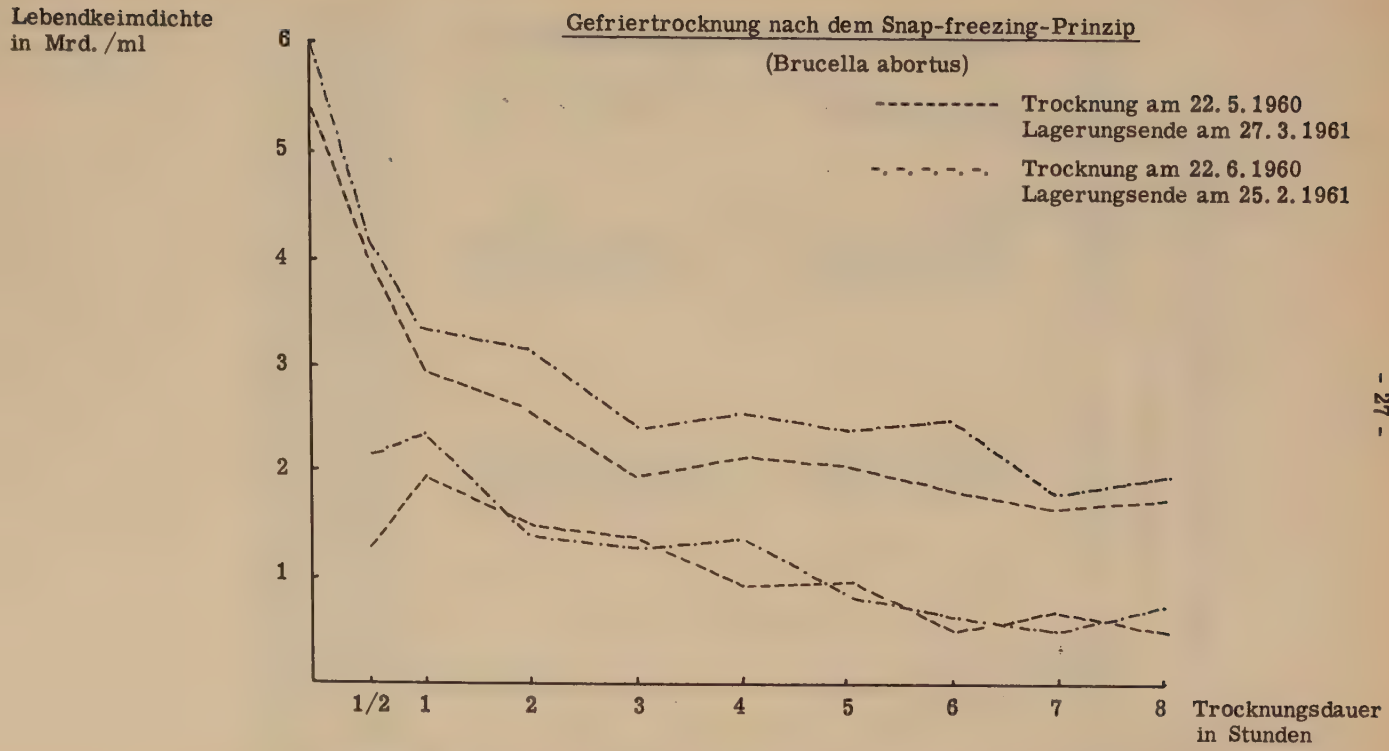
a) Versuche mit Brucella abortus St. 19

Gefriertrocknung nach dem Snap-freezing-Prinzip

Lebendkeimdichten in Mrd./ml

Trocknungsdauer in Stunden	am Versuchstag 22. 5. 1960	nach Lagerung 27. 3. 1961	Absterbe-quote
0	5,427		
1/2	4,05	1,2875	68 %
1	2,95	1,975	32 %
2	2,55	1,5	41 %
3	1,95	1,35	30 %
4	2,125	0,9125	57 %
5	2,025	0,95	53 %
6	1,825	0,51	72 %
7	1,66	0,625	63 %
8	1,75	0,48	72 %
	22. 6. 1960	25. 2. 1961	
0	5,937		
1/2	4,075	2,23	45 %
1	3,375	2,3875	30 %
2	3,166	1,4875	53 %
3	2,45	1,375	43 %
4	2,525	1,675	33 %
5	2,433	0,9	62 %
6	2,5	0,6625	73 %
7	1,766	0,5375	69 %
8	1,925	0,675	65 %

Während der Gefriertrocknung sank der Lebendkeimgehalt auf 32 % ab. Die in der ersten Trocknungsphase entnommenen Proben wiesen die niedrigste Absterbequote auf und besaßen nach Lagerungsende noch 38 % der ursprünglichen Lebendkeimdichte.



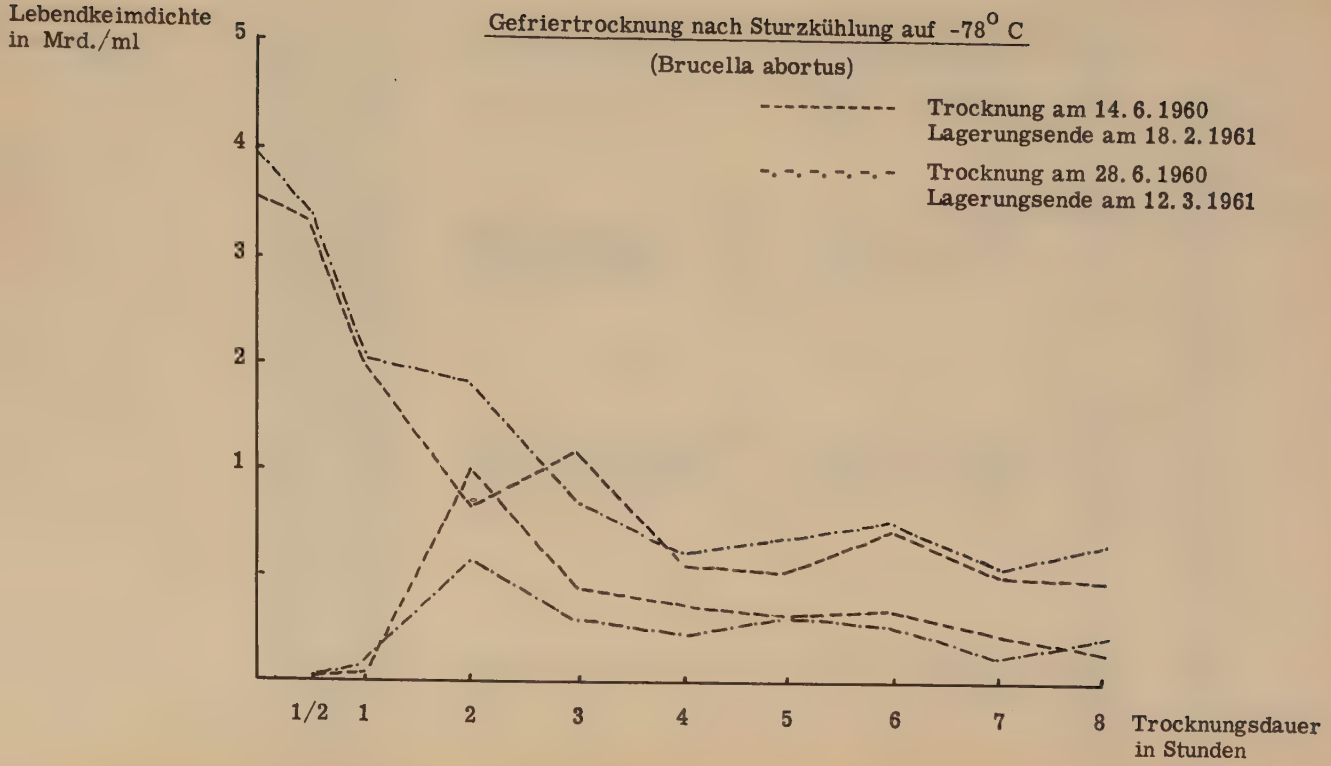
Dargestellt sind der Lebendkeimrückgang im Trocknungsverlauf und die am Lagerungsende vorgefundenen Überlebensraten nach unterschiedlicher Trocknungsdauer.

Gefriertrocknung nach Sturzkühlung auf -78° C

Lebendkeimdichten in Mrd. /ml

Trocknungsdauer in Stunden	am Versuchstag 14. 6. 1960	nach Lagerung 18. 2. 1961	Absterbe-quote
0	4,55		
1/2	4,325	0,013	99,7 %
1	2,933	0,068	97,7 %
2	1,625	1,975	0 %
3	2,175	0,85	61 %
4	1,1	0,72	36 %
5	1,033	0,625	38 %
6	1,425	0,64	52 %
7	1,025	0,425	58 %
8	0,975	0,25	74 %
	28. 6. 1960	12. 3. 1961	
0	4,95		
1/2	4,6	0,016	99,65%
1	3,033	0,05	98,4 %
2	2,8	1,125	60 %
3	1,75	0,56	68 %
4	1,225	0,45	63 %
5	1,375	0,6125	55 %
6	1,525	0,5375	64 %
7	1,125	0,275	75 %
8	1,33	0,36	73 %

Die 8 stündige Gefriertrocknung überlebten 24 % der Bakterien. In den bis 1 Stunde getrockneten Proben waren die Lebendkeime nach mehreren Monaten stark vermindert, da das Trockengut noch verflüssigen konnte. In der mittleren Trocknungsphase war die Lagerungsstabilität deutlich erhöht. Hier wurden nach Lagerungsabschluß maximale Überlebensraten gefunden, die durchschnittlich 33 % betrugen.

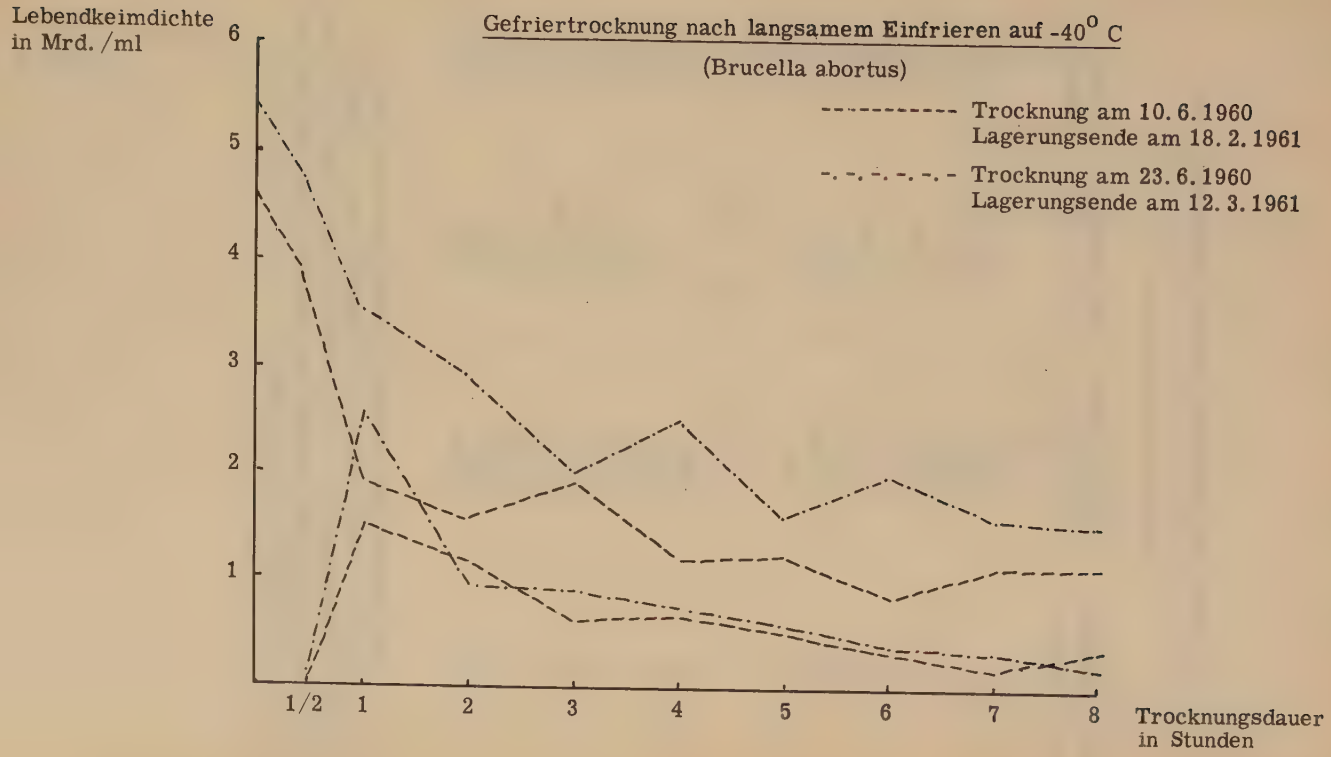

Lebendkeimdichte
in Mrd./ml
Gefriertrocknung nach Sturzkühlung auf -78° C
(Brucella abortus)
Trocknung am 14. 6. 1960
Lagerungsende am 18. 2. 1961
Trocknung am 28. 6. 1960
Lagerungsende am 12. 3. 1961
5
4
3
2
1
1/2
1
2
3
4
5
6
7
8
Trocknungsdauer
in Stunden

Gefriertrocknung nach langsamem Einfrieren auf -40° C

Lebendkeimdichten in Mrd./ml

Trocknungsdauer in Stunden	am Versuchstag 10. 6. 1960	nach Lagerung 18. 2. 1961	Absterbe-quote
0	4,635		
1/2	3,766	0,058	98,5 %
1	1,875	1,4875	20 %
2	1,575	1,125	29 %
3	1,933	0,6	69 %
4	1,2	0,65	46 %
5	1,225	0,5	52 %
6	0,85	0,2875	66 %
7	1,125	0,175	84 %
8	1,15	0,3	74 %
	23. 6. 1960	12. 3. 1961	
0	5,425		
1/2	4,725	0,032	99,3 %
1	3,53	2,5375	28 %
2	2,875	0,94	67 %
3	1,925	0,875	55 %
4	2,6	0,7125	72 %
5	1,633	0,58	64 %
6	2,0	0,36	82 %
7	1,625	0,3125	81 %
8	1,55	0,2375	86 %

Im Verlauf der Gefriertrocknung verminderte sich der Lebendkeimgehalt auf 26 %. Ein weiteres erhebliches Absterben trat während der Lagerung ein und betraf besonders die länger getrockneten Proben. Die höchsten Überlebensraten von durchschnittlich 44 % wurden nach Lagerungsende in den bereits nach 1 Stunde isolierten Ampullen gefunden.

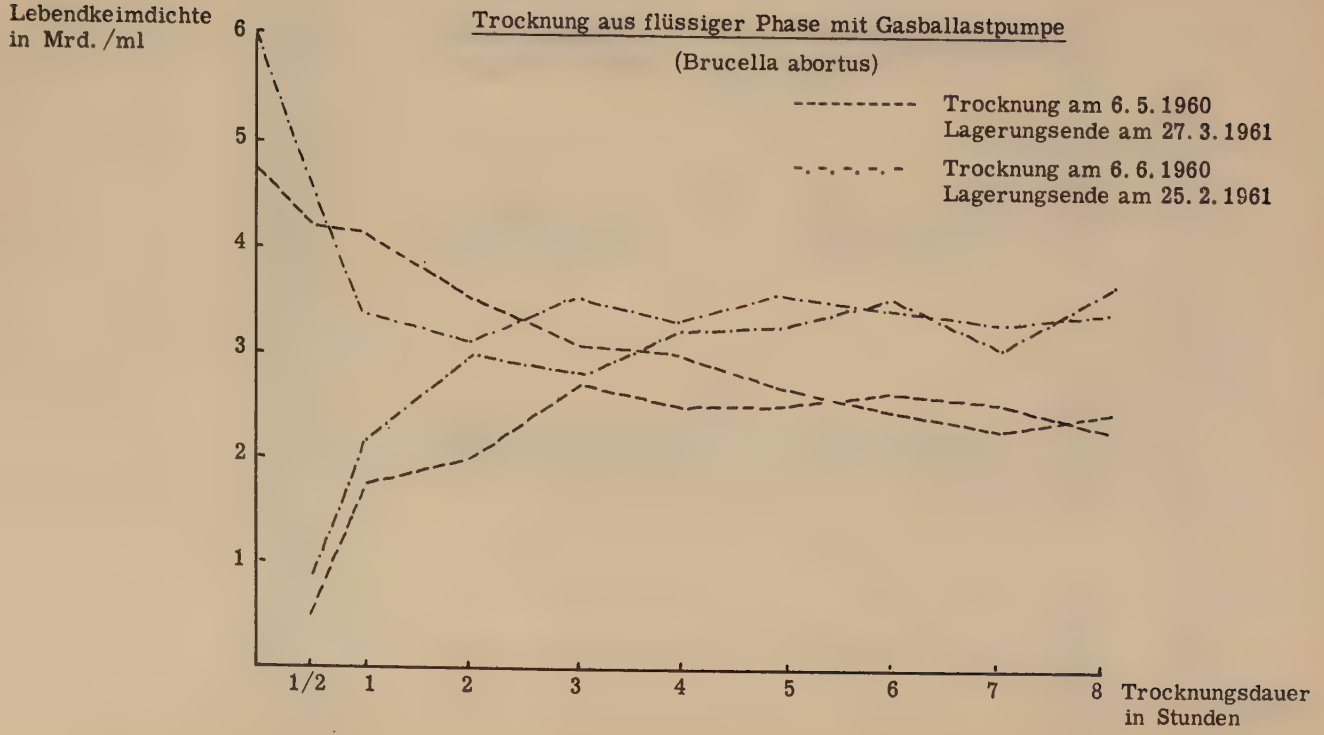

Gefriertrocknung nach langsamem Einfrieren auf -40° C
(Brucella abortus)
Trocknung am 10. 6. 1960
Lagerungsende am 18. 2. 1961
Trocknung am 23. 6. 1960
Lagerungsende am 12. 3. 1961
Lebendkeimdichte
in Mrd. /ml
6
5
4
3
2
1
1/2
1
2
3
4
5
6
7
8
Trocknungsdauer
in Stunden

Trocknung aus flüssiger Phase mit Gasballastpumpe

Lebendkeimdichten in Mrd. /ml

Trocknungsdauer in Stunden	am Versuchstag 6. 5. 1960	nach Lagerung 27. 3. 1961	Absterbe-quote
0	4,7125		
1/2	4,275	0,54	87 %
1	4,225	1,75	58 %
2	3,533	2,0	43 %
3	3,125	2,725	13 %
4	2,975	2,5	16 %
5	2,7	2,5875	4 %
6	-	2,65	-
7	2,325	2,54	0 %
8	2,45	2,35	4 %
	6. 6. 1960	25. 2. 1961	
0	5,95		
1/2	4,575	0,9	81 %
1	3,325	2,175	34 %
2	3,125	2,97	5 %
3	3,5	2,7875	20 %
4	3,35	3,2125	4 %
5	3,575	3,54	1 %
6	3,466	2,54	28 %
7	3,33	3,125	6 %
8	3,425	3,65	0 %

Den Trocknungsprozeß überlebten 56 % aller Brucellen; von der 4. Stunde an war kein signifikanter Keimverlust mehr erkennbar. Die Lagerungsstabilität war außerordentlich hoch, so daß nach über 8 monatiger Lagerung die gleiche Zahl lebender Keime wie am Versuchstag nachgewiesen werden konnte.

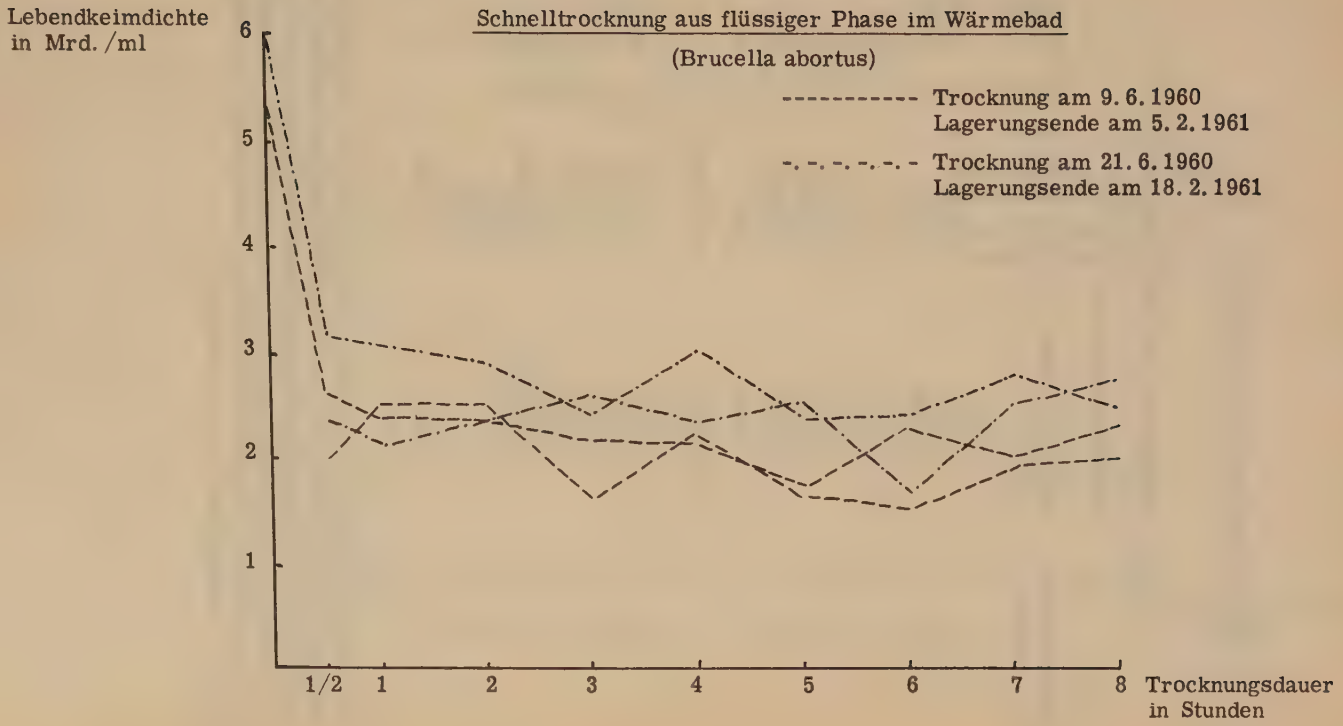

Lebendkeimdichte in Mrd. /ml
Trocknung aus flüssiger Phase mit Gasballastpumpe
(Brucella abortus)
Trocknung am 6. 5. 1960
Lagerungsende am 27. 3. 1961
Trocknung am 6. 6. 1960
Lagerungsende am 25. 2. 1961
6
5
4
3
2
1
1/2
1
2
3
4
5
6
7
8
Trocknungsdauer in Stunden

Schnelltrocknung aus flüssiger Phase im Wärmebad

Lebendkeimdichte in Mrd. /ml

Trocknungsdauer in Stunden	am Versuchstag 9. 6. 1960	nach Lagerung 25. 2. 1961	Absterbe-quote
0	5,125		
1/2	2,575	2,0	22 %
1	2,35	2,525	0 %
2	2,35	2,5125	0 %
3	2,15	1,6	25 %
4	2,15	2,225	0 %
5	1,7	1,65	1 %
6	2,3	1,525	34 %
7	1,975	1,8625	4 %
8	2,325	1,925	16 %
	21. 6. 1960	18. 2. 1961	
0	6,013		
1/2	3,175	2,35	26 %
1	3,1	2,15	30 %
2	2,925	2,35	20 %
3	2,4	2,6	0 %
4	3,0	2,35	21 %
5	2,4	2,525	0 %
6	2,375	1,7	28 %
7	2,775	2,5	10 %
8	2,475	2,75	0 %

Für die Schnelltrocknung im Wärmebad war ein Lebendkeimsturz innerhalb der ersten 1/2 Stunde auf ein Niveau kennzeichnend, das sich im weiteren Trocknungsverlauf nur unwesentlich verminderte. Die Überlebensraten lagen bei 38 % und blieben durch die Lagerung unbeeinflußt.


Lebendkeimdichte
in Mrd. /ml
Schnelltrocknung aus flüssiger Phase im Wärmebad
(Brucella abortus)
---------- Trocknung am 9. 6. 1960
Lagerungsende am 5. 2. 1961
-.-.-.-.-.- Trocknung am 21. 6. 1960
Lagerungsende am 18. 2. 1961
6
5
4
3
2
1
1/2
1
2
3
4
5
6
7
8
Trocknungsdauer
in Stunden

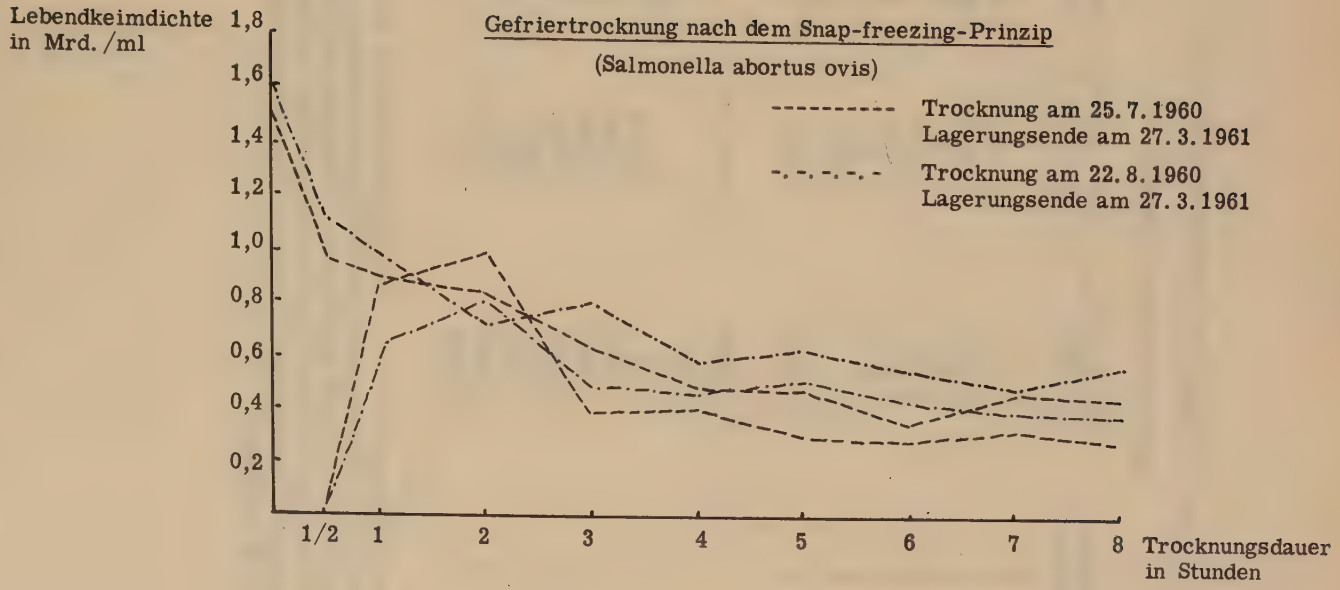
b) Versuche mit Salmonella abortus ovis

Gefriertrocknung nach dem Snap-freezing-Prinzip

Lebendkeimdichten in Mrd./ml

Trocknungsdauer in Stunden	am Versuchstag 25.7.1960	nach Lagerung 27.3.1961	Absterbequote
0	1,5015		
1/2	0,9725	0,0015	99,85 %
1	0,8925	0,89	0,28 %
2	0,84	1,0	0 %
3	0,645	0,41	36 %
4	0,5025	0,43	14 %
5	0,495	0,3025	39 %
6	0,375	0,3075	18 %
7	0,4875	0,3575	26 %
8	0,425	0,3	29 %
	22.8.1960	27.3.1961	
0	1,595		
1/2	1,125	0,0088	99,33 %
1	0,98	0,8125	35 %
2	0,735	0,8125	0 %
3	0,8025	0,5	39 %
4	0,585	0,4925	16 %
5	0,641	0,53	17 %
6	-	0,45	- %
7	0,5	0,425	15 %
8	0,6125	0,4125	33 %

Während des Trocknens verminderte sich die Zahl der überlebenden Keime auf durchschnittlich 30 %. Die größte Lagerungsstabilität wiesen die nach 2stündiger Trocknung entnommenen Proben auf, in denen die Ausgangsüberlebensrate von 65 % voll erhalten blieb. Die späteren Trocknungsphasen entstammenden Proben unterschieden sich hinsichtlich ihrer Absterbequote nur geringgradig.

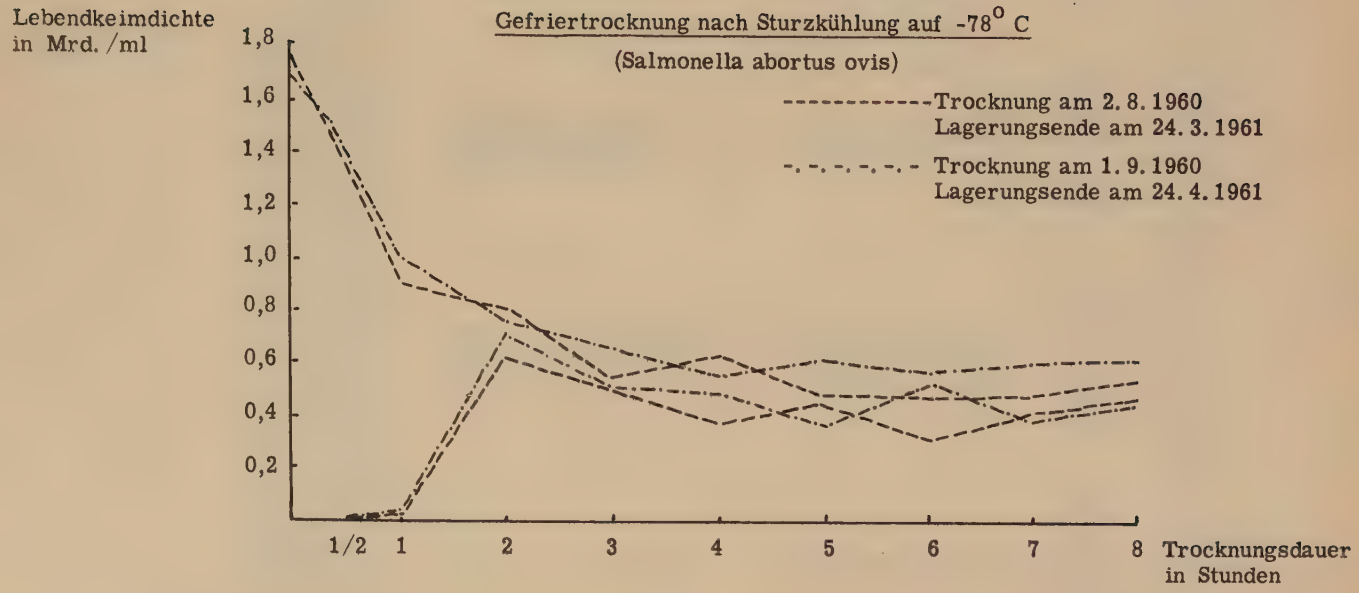

Lebendkeimdichte in Mrd. /ml
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
Gefriertrocknung nach dem Snap-freezing-Prinzip
(Salmonella abortus ovis)
Trocknung am 25. 7. 1960
Lagerungsende am 27. 3. 1961
Trocknung am 22. 8. 1960
Lagerungsende am 27. 3. 1961
1/2
1
2
3
4
5
6
7
8
Trocknungsdauer in Stunden

Gefriertrocknung nach Sturzkühlung auf -78° C

Lebendkeimdichten in Mrd./ml

Trocknungsdauer in Stunden	am Versuchstag 2.8.1960	nach Lagerung 24.3.1961	Absterbe-quote
0	1,75		
1/2	1,3975	0,0753	99,62 %
1	0,9125	0,0093	98,9 %
2	0,81	0,64	21 %
3	0,535	0,525	2 %
4	0,63	0,4925	22 %
5	0,4775	0,37	22 %
6	-	0,5225	- %
7	0,6	0,4	33 %
8	0,5475	0,465	15 %
	1.9.1960	22.4.1961	
0	1,6875		
1/2	1,44	0	100 %
1	1,03	0,0135	98,7 %
2	0,7725	0,725	14 %
3	0,667	0,5125	23 %
4	0,5725	0,3975	21 %
5	0,62	0,45	27 %
6	0,585	0,32	45 %
7	0,6175	0,4325	30 %
8	0,5925	0,5	16 %

Im Verlauf der Lyophilisation ging die Zahl der lebenden Keime auf 30 % zurück. Die Lagerungsstabilität war in allen Proben - mit Ausnahme der bis zur 1. Stunde getrockneten, in denen es zur Verflüssigung des Trockengutes kann - ziemlich ausgeglichen. Die höchsten Überlebensraten wurden daher in den nach 2 Stunden isolierten Ampullen mit 39 % gefunden.

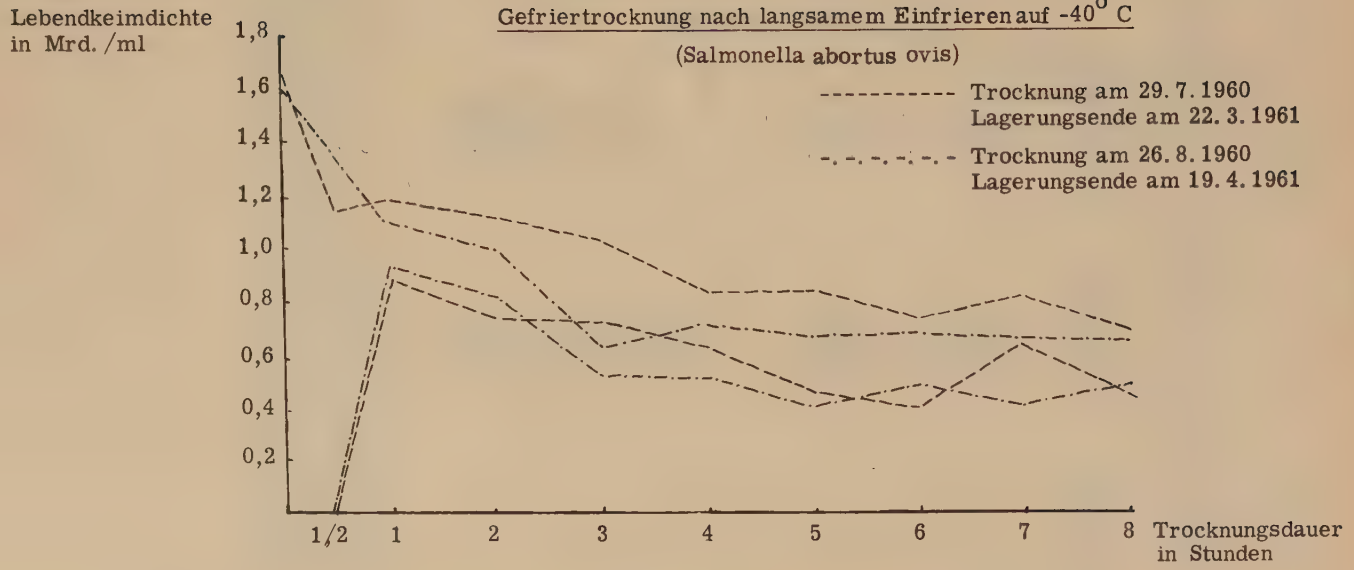

Lebendkeimdichte
in Mrd./ml
Gefriertrocknung nach Sturzkühlung auf -78° C
(Salmonella abortus ovis)
----------Trocknung am 2.8.1960
Lagerungsende am 24.3.1961
-.-.-.-.-.- Trocknung am 1.9.1960
Lagerungsende am 24.4.1961
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
1/2
1
2
3
4
5
6
7
8
Trocknungsdauer
in Stunden

Gefriertrocknung nach langsamem Einfrieren auf -40° C

Lebendkeimdichten in Mrd./ml

Trocknungsdauer in Stunden	am Versuchstag 29.7.1960	nach Lagerung 22.3.1961	Absterbe-quoten
0	1,65		
1/2	1,145	0,0015	99,87 %
1	1,195	0,8825	21 %
2	1,1325	0,75	32 %
3	1,06	0,7475	29 %
4	0,8425	0,65	23 %
5	0,855	0,48	44 %
6	0,7575	0,435	42 %
7	0,8425	0,67	20 %
8	0,7033	0,4825	31 %
	26.8.1960	19.4.1961	
0	1,625		
1/2	1,365	0,0007	99,95 %
1	1,125	0,935	17 %
2	1,045	0,82	21 %
3	0,645	0,53	18 %
4	0,725	0,5225	28 %
5	0,675	0,415	38 %
6	0,7	0,5025	28 %
7	0,685	0,4275	36 %
8	0,6775	0,5	26 %

Nach beendeter Gefriertrocknung wurden Überlebensraten von 45 % gefunden. Die Lagerungsstabilität wurde durch unterschiedliche Trocknungsdauer nicht beeinflußt, lediglich die noch feuchten Proben nach 1/2 stündiger Trocknung waren deutlich vermindert. Die maximalen Überlebensraten nach Lagerungsende betrugen 78 %.

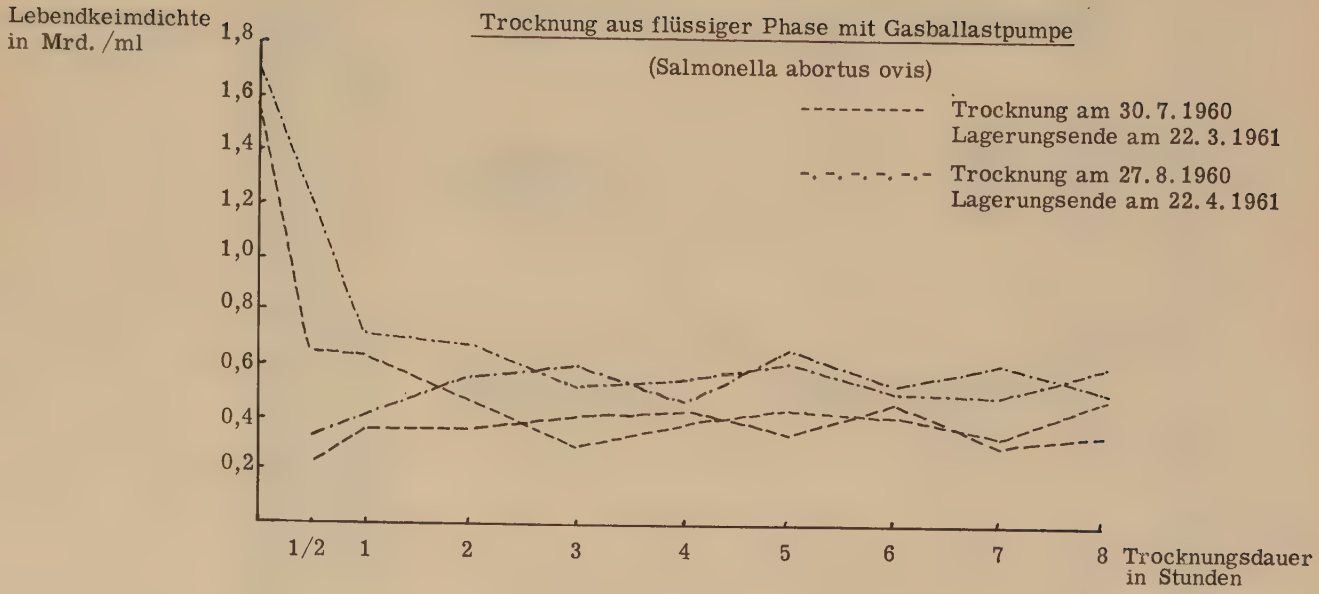

Lebendkeimdichte in Mrd. /ml
Gefriertrocknung nach langsamem Einfrieren auf -40° C
(Salmonella abortus ovis)
---------- Trocknung am 29. 7. 1960
Lagerungsende am 22. 3. 1961
-.-.-.-.-.- Trocknung am 26. 8. 1960
Lagerungsende am 19. 4. 1961
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
1/2
1
2
3
4
5
6
7
8
Trocknungsdauer in Stunden

Trocknung aus flüssiger Phase mit Gasballastpumpe

Lebendkeimdichten in Mrd. / ml

Trocknungsdauer in Stunden	am Versuchstag 30. 7. 1960	nach Lagerung 22. 3. 1961	Absterbe-quote
0	1,562		
1/2	0,6405	0,205	68 %
1	0,63	0,34	46 %
2	0,4667	0,3675	21 %
3	0,3	0,415	0 %
4	0,39	0,417	0 %
5	0,43	0,36	16 %
6	0,425	0,4533	0 %
7	0,3525	0,3075	13 %
8	0,4833	0,365	24 %
	27. 8. 1960	22. 4. 1961	
0	1,725		
1/2	0,86	0,34	60 %
1	0,715	0,4125	42 %
2	0,693	0,58	16 %
3	0,5266	0,615	0 %
4	0,553	0,475	14 %
5	0,61	0,6725	0 %
6	0,51	0,525	0 %
7	0,505	0,6125	0 %
8	0,6025	0,53	13 %

Nach Trocknungsbeginn erfolgte ein sturzartiger Lebendkeimrückgang, der etwa 1 Stunde lang anhielt. Danach blieb die Zahl der überlebenden Keime unverändert. Die mindestens 2 stündig getrockneten Präparate überstanden die Lagerung ohne Verluste. Die Überlebensraten betrugen durchschnittlich 29 %.

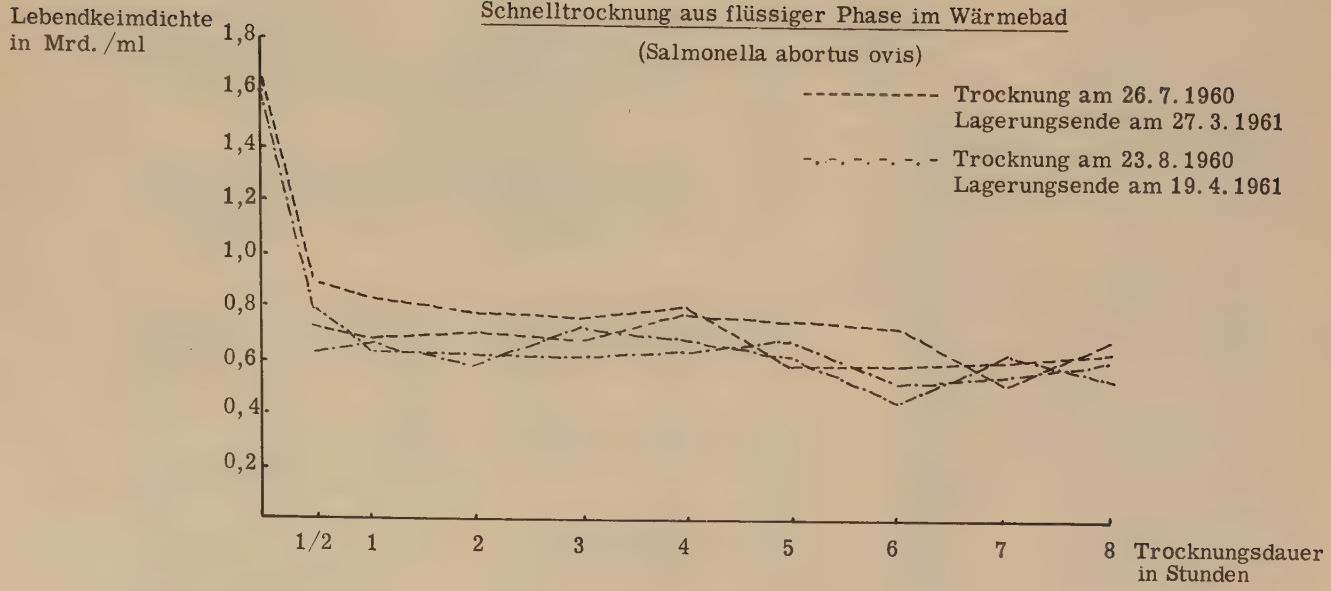

Lebendkeimdichte in Mrd. /ml
Trocknung aus flüssiger Phase mit Gasballastpumpe
(Salmonella abortus ovis)
Trocknung am 30. 7. 1960
Lagerungsende am 22. 3. 1961
Trocknung am 27. 8. 1960
Lagerungsende am 22. 4. 1961
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
1/2
1
2
3
4
5
6
7
8
Trocknungsdauer in Stunden

Schnelltrocknung aus flüssiger Phase im Wärmebad

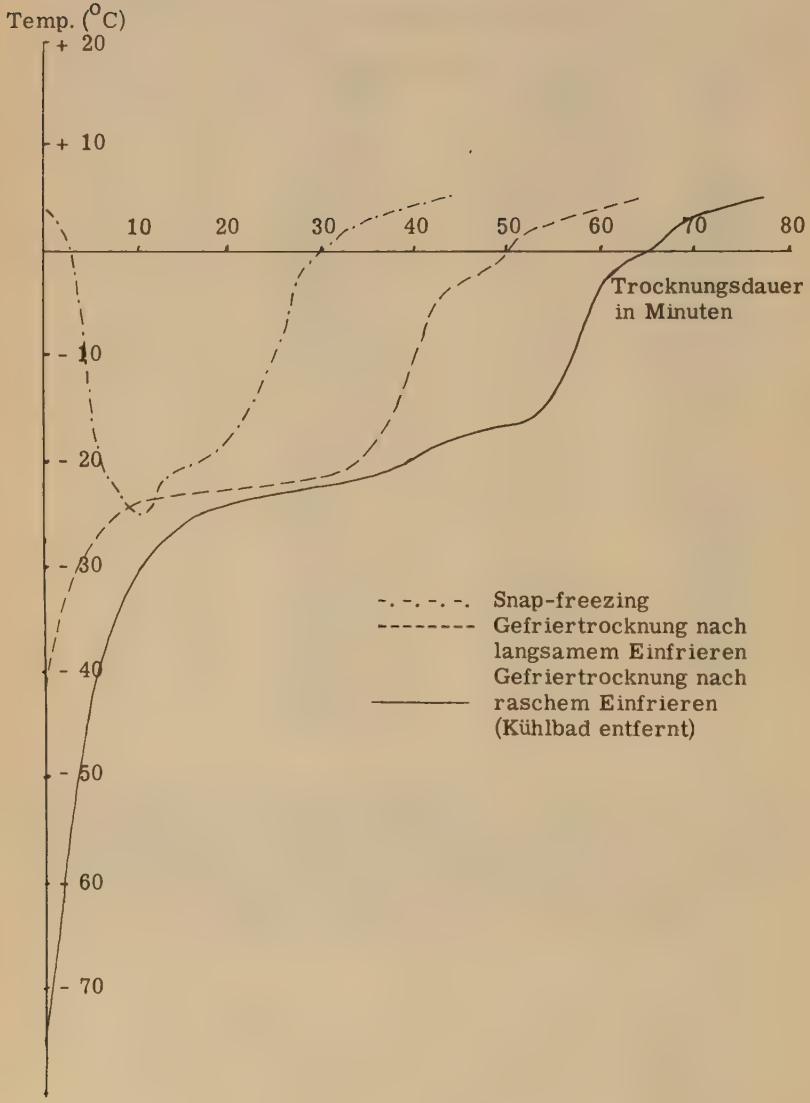
Lebendkeimdichten in Mrd. /ml

Trocknungsdauer in Stunden	am Versuchstag 26. 7. 1960	nach Lagerung 27. 3. 1961	Absterbe-quote
0	1,6525		
1/2	0,8875	0,7075	20 %
1	0,835	0,6725	20 %
2	0,775	0,7	9 %
3	0,773	0,68	12 %
4	0,785	-	- %
5	0,59	0,7675	0 %
6	0,58	0,7075	0 %
7	0,5975	0,5175	13 %
8	0,665	0,65	2 %
	23. 8. 1960	19. 4. 1961	
0	1,6		
1/2	0,785	0,63	20 %
1	0,65	0,68	0 %
2	0,635	0,6	5 %
3	0,6013	0,725	0 %
4	0,6433	0,695	0 %
5	0,675	0,6225	7 %
6	0,5125	0,465	9 %
7	0,52	0,605	0 %
8	0,6125	0,55	10 %

Ein signifikanter Lebendkeimrückgang wurde in der ersten 1/2 Stunde beobachtet. Ein weiterer, sehr flacher Abfall auf 33 % trat im weiteren Trocknungsverlauf in Erscheinung. Die mindestens 1 Stunde lang getrockneten Proben überstanden verlustlos die Lagerung. Es wurden nach Lagerungsende Überlebensraten von maximal 46 % gefunden.


Schnelltrocknung aus flüssiger Phase im Wärmebad
(Salmonella abortus ovis)
Lebendkeimdichte in Mrd. /ml
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
Trocknung am 26. 7. 1960
Lagerungsende am 27. 3. 1961
Trocknung am 23. 8. 1960
Lagerungsende am 19. 4. 1961
1/2
1
2
3
4
5
6
7
8
Trocknungsdauer in Stunden

c) Der Temperaturverlauf im Trockengut während der Haupttrocknungsphase bei Lyophilisation



d) Die Bestimmung der Restfeuchtigkeit

erfolgte in einer besonderen Versuchsserie mit Brucella abortus St. 19. Die Bakteriensuspension war mit denen der Hauptversuche identisch. In den folgenden Tabellen sind sämtliche Werte festgehalten, die zur Bestimmung der Restfeuchtigkeit ermittelt wurden. Die römischen Ziffern am Kopfteil der Tabellen haben folgende Bedeutung:

I = Trocknungsdauer in Stunden
II = Leergewicht der Ampullen in g
III = Bruttogewicht nach Trocknung (g)
IV = Bruttogewicht nach Excikatornachtrocknung (g)
V = Gewicht des Trockengutes in mg
VI = Gewicht des entfernten Restwassers (mg)
VII = Restfeuchtigkeit

Gefriertrocknung nach dem Snap-freezing-Prinzip

I	II	III	IV	V	VI	VII
1/2	8,56779	8,57628	8,575755	8,49	0,525	6,2 %
1	9,14449	9,15286	9,1524	8,37	0,46	5,5 %
2	9,34988	9,35807	9,35765	8,19	0,42	5,1 %
3	9,13876	9,146995	9,1467	8,235	0,295	3,6 %
4	9,66765	9,67565	9,67544	8,0	0,21	2,6 %
5	10,13768	10,14592	10,145805	8,14	0,115	1,4 %
6	8,95682	8,96477	8,96469	7,95	0,08	1,1 %
7	9,08809	9,09606	9,095965	7,97	0,095	1,2 %
8	8,543	8,55101	8,550935	8,01	0,075	0,94 %

Gefriertrocknung nach Sturzkühlung auf -78° C

I	II	III	IV	V	VI	VII
1/2	9,46367	9,57149	9,47114	107,82	100,35	93,5 %
1	9,38765	9,40363	9,395045	15,98	8,585	53,7 %
2	8,86755	8,8757	8,875285	8,15	0,415	5,1 %
3	9,16247	9,17039	9,17	7,92	0,39	4,9 %
4	9,951	9,95856	9,9582	7,56	0,36	4,8 %
5	9,108935	9,116965	9,116725	8,03	0,24	3,0 %
6	8,43485	8,44295	8,44282	8,1	0,13	1,6 %
7	8,268	8,27584	8,27573	7,84	0,11	1,4 %
8	7,79565	7,80361	7,803515	7,96	0,095	1,2 %

Gefriertrocknung nach langsamem Einfrieren auf -40° C

I	II	III	IV	V	VI	VII
1/2	8,02097	8,04492	8,02771	23,95	17,21	72 %
1	8,68536	8,69353	8,693095	8,17	0,435	5,3 %
2	8,9194	8,92769	8,92726	8,29	0,43	5,2 %
3	8,75881	8,76656	8,766265	7,75	0,295	3,8 %
4	8,511	8,518775	8,51856	7,775	0,215	2,8 %
5	8,712765	8,720395	8,720265	7,63	0,13	1,7 %
6	8.75776	8,76547	8,7654	7,71	0,07	0,9 %
7	8,65975	8,66759	8,667455	7,84	0,135	1,7 %
8	9,647825	9,65565	9,65554	7,825	0,11	1,4 %

Trocknung aus flüssiger Phase mit Gasballastpumpe

I	II	III	IV	V	VI	VII
1/2	8,71678	8,735995	8,72419	19,215	11,805	61,3 %
1	8,84725	8,85608	8,85511	8,83	0,97	11 %
2	8,81425	8,82287	8,822115	8,62	0,755	8,8 %
3	8,322135	8,330625	8,330095	8,49	0,53	6,2 %
4	8,6959	8,70426	8,70381	8,36	0,45	5,4 %
5	8,620725	8,628875	8,62841	8,15	0,465	5,7 %
6	8,458515	8,466465	8,466155	7,95	0,31	3,9 %
7	8,325575	8,333815	8,33347	8,24	0,345	4,2 %
8	8,555675	8,563555	8,56332	7,88	0,235	3,0 %

Schnelltrocknung aus flüssiger Phase im Wärmebad

I	II	III	IV	V	VI	VII
1/2	8,34489	8,35324	8,35229	8,35	1,095	12,2 %
1	8,05721	8,06544	8,065035	8,23	0,405	4,9 %
2	8,934175	8,942445	8,94202	8,27	0,425	5,1 %
3	8,34395	8,352	8,351605	8,05	0,395	4,9 %
4	9,977335	9,985165	9,984785	7,88	0,38	4,8 %
5	10,51865	10,526255	10,515995	7,605	0,26	3,4 %
6	8,29095	8,29928	8,29907	8,33	0,21	2,5 %
7	8,94945	8,95732	8,957185	7,87	0,135	1,7 %
8	8,60571	8,6135	8,613345	7,79	0,155	2,0 %

Die Haupttrocknungsphase wurde in Abhängigkeit von der angewandten Trocknungsmethode mehr oder weniger schnell durchschritten. Restfeuchtigkeitswerte unter 10 % lagen bei Trocknungen nach dem Snap-freezing-Prinzip bereits nach 1/2 Stunde vor. Nach Ablauf 1 Stunde hatten die nach langsamem Einfrieren lyophilisierten Proben und die der Schnelltrocknung diese Grenze unterschritten. Der gleiche Status wurde bei Langsamtrocknung und Gefriertrocknung nach raschem Einfrieren erst nach 2 Stunden erreicht.

Durch Lyophilisation waren höhere Sublimationsraten erzielbar. Die durchschnittlichen Restfeuchtigkeitswerte betrugen nach 8 stündiger Gefriertrocknung 1,18 %, und nach Trocknung aus flüssiger Phase 2,5 %. Innerhalb der Einfachtrocknungen wurden nach Schnelltrocknung mit Kältefalle um 1 % niedrigere Restfeuchten vorgefunden.

IV. Besprechung der Versuchsergebnisse und Diskussion

Die im Verlauf jeder Trocknung auftretenden Lebendkeimverluste verteilten sich unterschiedlich auf die einzelnen Trocknungsabschnitte. Sie waren in den Anfangsphasen am größten und gingen mit fortschreitender Trocknung immer mehr zurück, so daß sich das charakteristische Bild eines logarithmischen Keimabfalles ergab. Die nach 8 stündiger Konservierung vorgefundenen Überlebensraten zeigten eine deutliche Abhängigkeit zu der angewandten Methodik und der benutzten Keimart.

Bei den Brucellen erwiesen sich die reinen Trocknungen aus flüssiger Phase als am günstigsten, wobei die Langsamtrocknung mit Überlebensraten von 56 % erheblich besser abschnitt als die Schnelltrocknung mit nur 38 %. In weiterem Abstand folgten die Gefriertrocknungen: Snapfreezing mit 32 % überlebenden Keimen, Lyophilisation nach langsamem Einfrieren mit 25 % und nach raschem Einfrieren mit 24 %.

Bei den Salmonellen hingegen konnten maximale Überlebensraten von 45 % durch Gefriertrocknung nach langsamem Einfrieren erzielt werden. Es folgten die Schnelltrocknung mit 37 % und die drei anderen Verfahren, die mit 30 bzw. 29 % etwa in gleicher Höhe lagen.

Aus dieser Zusammenstellung ist ersichtlich, daß sich die quantitativen Ausbeuten an überlebenden Bakterien in erheblichem Maße durch ein Variieren der Trocknungstechnik beeinflussen lassen. Interessante Beiträge zu dieser Frage lieferten STAMP, B. SCHMIDT und FELDMANN, die in Parallelversuchen mit gleichen Keimarten die Überlegenheit der Trocknung aus flüssiger Phase über die Lyophilisation demonstrieren konnten. Wir fanden diese Ergebnisse bei Brucella abortus voll bestätigt und stellten innerhalb beider Trocknungsverfahren eine schonendere Wirkung des langsamen Wasserentzuges fest. Bei Salmonella abortus ovis hingegen überwog eines der angewandten Lyophilisationsverfahren. Eine vergleichende Betrachtung der Einfachtrocknungen ließ bei diesem Keim, entsprechend den Empfehlungen FICKER's, die bessere Verträglichkeit des raschen Wasserentzuges erkennen.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, daß sich, unter sonst gleichen Versuchsbedingungen, nicht bei allen Keimen maximale Überlebensraten durch Trocknung aus flüssiger Phase erzielen lassen. Ferner ergab sich, daß man durch die Wahl geeigneter Verdampfungsgeschwindigkeiten den Konservierungsprozeß der jeweiligen Bakterienart anpassen und die Ausbeuten an lebenden Keimen verbessern kann.

Bei den Gefriertrocknungen standen sich Snap-freezing und Lyophilisation nach langsamem und raschem Einfrieren gegenüber. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen von NEUMANN, HÖRTER und B. SCHMIDT konnten wir an beiden geprüften Keimen die günstigere Wirkung des langsamen Vorfrierens feststellen. Dieser Effekt war besonders deutlich bei den Salmonellen ausgeprägt, die 15 % höhere

Trocknungsverluste durch Lyophilisation nach Sturzkühlung erlitten. Brucella abortus vertrug beide Verfahren nahezu gleich gut, zeigte aber ein um 6 - 8 % erniedrigtes Absterben, wenn es nach dem Snap-freezing-Prinzip behandelt wurde. Gleiche Erfahrungen machte B. SCHMIDT, der bei E. coli und Micrococcus pyogenes die Snap-freezing-Technik den normalen Gefriertrocknungen überlegen fand. Möglicherweise ist die bessere Verträglichkeit der Snap-freezing-Lyophilisation auf die dem Einfrieren vorausgehende Volumeneinengung zurückzuführen, da nach den Erfahrungen RECORD's und TAYLOR's größere Keimdichten den Umfang der Trocknungsverluste reduzieren.

Mit den höchsten Lebendkeimeinbußen waren bei beiden geprüften Keimarten die Gefriertrocknungen verbunden, denen eine sturzartige Abkühlung der Suspensionen vorausging. Diese Ergebnisse überraschten insofern, als sich die Temperatur während des Trocknungsprozesses langsam einem Gleichgewichtswert näherte, währenddessen eine Auskristallisation der schädlichen, durch den Einfriermodus bedingten glasigen Strukturen zu erwarten war. Es ist daher wohl in Übereinstimmung mit den zuvor genannten Autoren berechtigt, im Gegensatz zu den Empfehlungen von REY und LYET, einem langsamen Einfrieren des Bakterienmaterials den Vorzug zu geben. Allerdings bemerkt HÖRTER hierzu einschränkend, daß sich bei bestimmten Keimarten oder veränderten Schutzlösungen die Notwendigkeit einer Umkehrung ergeben kann. MAZUR führt die günstige Wirkung des langsamen Einfrierens auf die osmotische Aktivität der bei dieser Behandlung zunächst nur extrazellulär wachsenden Eiskristalle zurück, wodurch die Zellen an Wasser verarmen und den Kältenoxen mehr Widerstand entgegenzusetzen vermögen. Daß ein Wasserentzug aus nicht gefrorenen Zellen keine irreversiblen Schäden durch Eiweißdenaturierung infolge Entquellung oder Aussalzung hervorzurufen braucht, ist aus den günstigen Resultaten der zitierten Autoren und von uns bei Anwendung der Einfachtrocknung durch Destillation ersichtlich. Da wir in unseren Versuchen, in Übereinstimmung mit NEUMANN, nach langsamem Einfrieren erhöhte Verdampfungsgeschwindigkeiten beobachteten, wurde der Temperaturbereich der Haupttrocknungsphase, welcher mit -17^{o} bis -24^{o} C noch innerhalb des Eutektikums lag, kürzere Zeit beibehalten als nach Sturzkühlung. Das langsam eingefrorene Trocknungsgut war also eventuellen eutektischen Noxen weniger lang ausgesetzt als das rasch eingefrorene.

Die von uns erreichten Überlebensraten liegen in mittleren Bereichen. O. SCHMIDT fand nach Gefriertrocknung von Brucella abortus weniger als 10^{-6} aller ursprünglichen Keime lebend vor, HÖRTER verzeichnete Überlebensraten von 32,5 bis 50 %, VAN DER SCHEER 82 %, JENDRUSCH bis zu 97 % und ULBRICH 100 %. HÖRTER gibt für Sal. ab. ovis Überlebensraten von 22 - 27 % an.

Ein wichtiger, die Überlebensraten limitierender Faktor ist die Keimdichte der den Trocknungen unterworfenen Suspensionen. Bereits FICKER und später OTTEN wiesen bei Trocknungen aus flüssiger Phase auf diese Eigentümlichkeit hin. Für Gefriertrocknungen stammen diesbezügliche Mitteilungen von RECORD und TAYLOR sowie OBAYASHI (1961), der in seinen Untersuchungen allerdings nur auf die La-

gerungsstabilität lyophilisierter Trockenpräparate eingeht. Unsere bei Brucellen erzielten Überlebensraten liegen für die Gefriertrocknungen niedriger als die HÖRTER's, der seine Kulturen mit geringen Mengen des unverdünnten Stabilisators, Magermilch mit 7,5 % Glukosezusatz, abschwemmte und die so gewonnenen Suspensionen gefriertrocknete. Mit hohen Dichten von über 100 · 10^9 Keimen/ml arbeiteten auch ULBRICH, VAN DER SCHEER und JENDRUSCH. Unsere Suspensionen enthielten 6 · 10^9 Keime/ml und 50 % Magermilch als Stabilisator; sie waren also von erheblich geringerer Konzentration als die der erwähnten Autoren. Ein weiteres Moment zur Erzielung maximaler Überlebensraten ist die Zusammensetzung der Schutzlösung. Dabei scheint reduzierenden Substanzen eine besondere Bedeutung zuzufallen, wie aus den Versuchsergebnissen von VAN DER SCHEER und JENDRUSCH hervorgeht. Bei beiden Autoren starben etwa 50 % oder mehr aller Brucellen während des Trocknungsverlaufes ab, wenn das Schutzmedium ohne Redoxsystem verwendet wurde. Wir erreichten bei Brucella abortus optimale Überlebensraten durch einfache Trocknung aus flüssiger Phase. Da dieses Verfahren - im Gegensatz zu den Gefriertrocknungen - mit einer beträchtlichen Volumeneinengung verbunden war, mußte zwangsläufig die Keimdichte um das mindestens 10fache ansteigen. Dieser Konzentrationszuwachs dürfte, abgesehen von dem Wegfall der Kältenoxen, in erheblichem Maße für die günstigen Resultate mitentscheidend gewesen sein. Daß sich diese Ergebnisse nicht in vollem Umfang bei Sal. abortus ovis bestätigen ließen, könnte ursächlich auf einer individuell bedingten, abweichenden Tenazität beruhen.

Hinsichtlich der Lagerungsstabilität herrschte bei den reinen Trocknungsprodukten beider Keimarten volle Übereinstimmung, während sich die Präparate der Gefriertrocknungen in wesentlichen Punkten unterschieden. Allgemein wurde festgestellt, daß sich während des Trocknungsprozesses der Feuchtigkeitsgehalt in den Proben laufend vermindert und daß dieser fortschreitende Wasserentzug mit einem Absterben der Zellen einhergeht. Über gleiche Erfahrungen geben die Berichte von FRY, RECORD und TAYLOR, VAN DER SCHEER und B. SCHMIDT Auskunft. Der Austrocknungsgrad war für die Haltbarkeit der Brucellenpräparate ein außerordentlich wichtiges Moment, während er bei den Salmonellen weniger ins Gewicht fiel.

Da unter unseren Versuchsbedingungen die Haupttrocknungsphase sehr schnell durchlaufen wurde, waren bei den Lyophilisationen Restfeuchtigkeitswerte von unter 10 % schon in sehr frühen Trocknungsstadien erreicht. Bei den Brucellen hatten die ersten aus dem Prozeß isolierten, makroskopisch trockenen Proben eine Restfeuchtigkeit zwischen 6,2 und 5 % und wiesen naturgemäß einen höheren Lebendkeimgehalt auf, als die nach 8 stündiger Behandlung gewonnenen Proben, in denen RF-Werte von durchschnittlich 1,2 % vorlagen. Dieser Vorsprung wurde durch 8 - 11 monatige Kühlschranklagerung nicht eingebüßt, auch blieben die Absterbequoten mit durchschnittlich 28 % wesentlich niedriger als die der längere Zeit getrockneten Präparate. Kennzeichnend für die Brucellen waren maximale Lagerungsverluste in Höhe von 70 - 86 % nach 8 stündiger Gefriertrocknung bei einer Restfeuchte von ca. 1,2 %. Die höchsten Überlebensraten wurden nach Lagerungsende in den Proben mit RF-Werten zwischen 4,8 und 6,2 % gefunden.

Die lagerungsbedingten Absterbequoten blieben minimal und in etwa gleicher Höhe bis zu einer Restfeuchtigkeit von ca. 2 % und stiegen bei niedrigeren Werten erheblich an. Als typisches Beispiel sei die Gefriertrocknung vom 23. 6. 1960 zitiert, deren extreme Überlebensraten vom Versuchstag und nach Lagerungsabschluß auf die Ausgangssuspension bezogen sind: Nach 1 stündiger Trocknung, bei einer Restfeuchte von 5,3 %, wurden Überlebensraten von 65 % gefunden, die durch die Lagerung auf 45 % zurückgingen. Nach 8 stündiger Trocknung, bei einer RF von 1,4 %, lebten noch 28,5 % aller Keime; 9 Monate später waren sie auf 4,4 % dezimiert.

Es zeigte sich also, daß bei Brucella abortus Restfeuchten unter 2 % die Lagerungsstabilität erheblich verschlechtern. Daß sich diese Verluste durch besonders zusammengesetzte Schutzlösungen kompensieren lassen, ist aus den Ausführungen von JENDRUSCH und VAN DER SCHEER ersichtlich. Ein weiterer wichtiger Faktor scheint die Dichte und Kompaktheit des Trockengutes zu sein, wie aus unseren Ergebnissen nach Einfachtrocknung aus flüssiger Phase hervorgeht. Untersuchungen OBAYASHI's (1961) lassen bei Lact.bifidus beträchtlich verminderte Lagerungsverluste erkennen, wenn 10fach höhere Keimdichten lyophilisiert wurden. Während der Einfachtrocknungen wurde ein solcher Konzentrationsanstieg durch Evaporation herbeigeführt. Die Produkte dieser Verfahren zeichneten sich durch hohe Lagerungskonstanz aus, sobald die RF-Werte unter 6 % abgesunken waren. Die Resultate der Schnelltrocknungen lassen außerdem, im Gegensatz zu den Lyophilisationen, eine stärkere Austrocknungstoleranz erkennen, da Restfeuchten unter 2 % schadlos vertragen wurden. Überhaupt war das hervorstechende Merkmal der Einfachtrocknungen, daß auch nach 11monatiger Lagerung noch die gleiche Zahl lebender Brucellen angetroffen wurde, wie am Versuchstag. Die günstigen Ergebnisse von CAMERON, STAMP, LEIFSON und FELDMANN konnten quantitativ voll bestätigt werden. Ebenso der STAMP'sche Hinweis auf verminderte Sublimationsraten nach Einfachtrocknung, da wir nach Lyophilisation regelmäßig niedrigere RF-Werte fanden.

B. SCHMIDT sieht als eine der Ursachen des günstigeren Abschneidens der Einfachtrocknungen den Wegfall der Kältenoxen an, die vor allem nach extremen Temperatureinwirkungen eine Anfälligkeit des Zelleibes gegenüber der Lyophilisation bedingen sollen. Daß sich diese Noxen auch graduell verschieden nach dem Konservierungsprozeß im Verlauf der Lagerung bemerkbar machen können, geht aus den Untersuchungen HECKLY's hervor, der bei Brucella melitensis wesentlich höhere Lagerungsverluste in der nach Sturzkühlung lyophilisierten Charge feststellen konnte als in der nach dem Snap-freezing-Prinzip behandelten. Unsere Versuche ergeben keine Anhaltspunkte einer ähnlichen Beziehung zwischen Lyophilisationsverfahren und Lagerungsstabilität. Die Ergebnisse von JENDRUSCH, OBAYASHI (1960, 1961), GRAEVES und SCOTT lassen den Schluß zu, daß hierfür in erster Linie die Zusammensetzung der Schutzlösung und die verwendete Suspensionsdichte bestimmend sind.

Unsere optimalen RF-Werte von durchschnittlich 5,2 % und bis 2 % stimmen mit den von VOSS (1960) empfohlenen (2 - 5 %) überein. Die übrigen, im Schrifttum angegebenen, liegen mehr oder weniger tiefer. HUTTON und HILMOE plädieren für 0,2 bis 0,3 %, FRY für Werte oberhalb 1 % und JENDRUSCH für den Bereich zwischen 0,2 und 2 %.

Eine Restfeuchte von 5,2 % wurde während unserer Gefriertrocknungen im Anschluß an die relativ kurze Haupttrocknungsphase erreicht. Da die Entfernung des Restwassers einen weiteren Keimtod einschloß, enthielten die in den ersten Trocknungsstadien entnommenen Proben höhere Überlebensraten als die länger getrockneten. Dieser Vorsprung ging nicht verloren, da die Lagerungsstabilität im RF-Bereich unterhalb 5,2 % schwächer wurde und ab 2 % deutlich herabgesetzt war. Es kann daher gefolgert werden, daß die Optimalwerte für Brucellen bei einer Restfeuchtigkeit oberhalb 2 % liegen. Allerdings bleibt die Frage offen, ob die minimalen Absterbequoten, die bei einer RF von 5,2 % gefunden wurden, auch unter Belastungsbedingungen von Bestand sind.

Die Salmonellen stimmten hinsichtlich der Lagerungsstabilität nach Einfachtrocknung mit den Brucellen voll überein. Waren die Proben wenigstens 2 Stunden getrocknet, so ließ ein 8monatiger Kühlschrankaufenthalt die Überlebensraten unbeeinflußt. Auf die starke Trocknungsresistenz der Bakterien der Typhus-Paratyphusgruppe weisen schon die Berichte von FICKER, HEIM und später OTTEN und LEIFSON hin. BUXTON erwähnt sie im Zusammenhang mit epidemiologischen Fragen.

Die Auszählungsbefunde nach Lagerung der lyophilisierten Proben ließen, verglichen mit den Brucellen, keine so engen Beziehungen zwischen Lagerungsstabilität und Restfeuchtigkeit erkennen. Die geringsten Absterbequoten - sie lagen zwischen 0 und 15 % - wurden auch hier in den unmittelbar nach der Haupttrocknungsphase isolierten Ampullen gefunden. Die länger getrockneten Proben waren einheitlich um 20 bis 30 % vermindert. HÖRTER gibt für Salmonella abortus ovis nach 6monatiger Kühlschranklagerung Absterbequoten von 15 % an.

Die von uns während der Haupttrocknungsphase beobachteten Temperaturen lagen im Bereich von -17^{o} bis -24^{o} C. Sie stellen einen Gleichgewichtszustand zwischen Verdampfungskälte und Wärmekonvektion der Außenluft dar. FLOSDORF und MUDD geben als Temperaturgleichgewicht bei Plasmatrocknung -17^{o} C an. HUTTON und HILMOE fordern für Brucella abortus Trocknungstemperaturen unterhalb -20^{o} C. Gegenteiliger Auffassung ist STABLEFORTH, der aufgrund der Erfahrungen der amerikanischen Impfstoffindustrie bei der Herstellung lyophilisierter Bang-Lebendvakzine Trocknungstemperaturen zwischen -10^{o} und -20^{o} C für ausreichend hält. VOSS sieht im Hinblick auf die Gefahr multifokaler Erhöhungen der Salzkonzentration Temperaturen jenseits des eutektischen Punktes von $CaCl_2$, der bei -54^{o} C liegt, als optimal an, obwohl er z. T. widersprüchliche Ergebnisse erhielt, als er eine Reihe von Diphtheriestämmen bei Temperaturen von -20^{o} bis -60^{o} C lyophilisierte. HECKLY prüfte bei Brucella melitensis Temperaturen von -18^{o} und -28^{o} C und fand in beiden Chargen gleiche Überlebensraten. Auch B. SCHMIDT mißt tiefen Trocknungstempera-

turen von -30° C keine besondere Bedeutung bei, da er wesentlich verbesserte Überlebensraten nach Snap-freezing bei Zimmertemperatur fand.

Unter diesen Gesichtspunkten kann angenommen werden, daß unsere Trocknungsverluste nur zu einem geringen Teil auf das Konto der Trocknungstemperaturen gehen. Trotzdem ist tieferen Trocknungstemperaturen der Vorzug zu geben; MUGGLETON empfiehlt solche unterhalb -30° C, da sie konstantere Versuchsbedingungen schaffen und Auftauschäden mit Sicherheit ausschließen. Unsere Experimente wurden nach dem FLOSDORF-MUDD'schen Prinzip, das keine Kühlung während des Trocknens vorsieht, durchgeführt, da sich sonst erhebliche arbeitstechnische Schwierigkeiten ergeben hätten.

Jedes unserer angewandten Lyophilisationsverfahren zeichnete sich durch einen charakteristischen Temperaturverlauf aus. Die nach dem Snap-freezing-Prinzip behandelten Proben sanken innerhalb von 5 Minuten auf unter -20° C, steigerten sich schließlich auf -26° C und glichen sich nach 20 - 25 Minuten, nachdem alles Eis abgeschieden war, der Umgebungstemperatur an. Brucella abortus vertrug diese Methode am besten von allen Lyophilisationen. Infolge der schnelleren Verdampfung bei Gefriertrocknungen nach langsamem Einfrieren lag hier das Temperaturbereich der Haupttrocknungsphase (-17° bis -24° C) nur 30 Minuten lang vor, gegen fast 45 Minuten nach raschem Einfrieren. Der durch das langsame Einfrieren bedingte Trocknungsverlauf erwies sich bei Salmonella abortus ovis als am günstigsten.

V. Zusammenfassung

An zwei Bakterienstämmen, Brucella abortus und Salmonella abortus ovis, wurden 5 verschiedene Trocknungs- und Gefriertrocknungsverfahren geprüft. Als Apparatur diente ein in Anlehnung an FLOSDORF und MUDD konstruierter Trockenrechen. Während des Konservierungsprozesses wurden in festgelegten Zeitabständen je zwei Ampullen abgezogen, die am Versuchstag und nach 8 - 11monatiger Kühlschranklagerung zur Auszählung gelangten. Es sollte, in Abhängigkeit von dem angewandten Verfahren, der Keimtod im Trocknungsverlauf verfolgt und die Lagerungsstabilität bei unterschiedlicher Restfeuchtigkeit bestimmt werden. Die Ergebnisse lassen sich in nachstehenden Punkten zusammenfassen:

1) Jeder Konservierungsprozeß war von einem Lebendkeimrückgang begleitet, der sich mit fortschreitender Trocknung allmählich verringerte.

2) Die Höhe der Überlebensraten nach 8 stündiger Trocknung zeigte bei beiden geprüften Keimarten deutliche Beziehungen zu dem angewandten Verfahren. Die Brucellen vertrugen am besten eine langsame Einfachtrocknung, während sich bei den Salmonellen eine Lyophilisation nach langsamem Einfrieren als überlegen erwies.

3) Hinsichtlich der Lagerungsstabilität waren bei beiden Keimarten nach Einfachtrocknung aus flüssiger Phase keine Unterschiede erkennbar. Eine 8 - 11monatige Kühlschranklagerung wurde ohne Verminderung der Lebendkeimzahl überstanden, wenn RF-Werte unterhalb 6 % vorlagen.

4) Die Lagerungsstabilität der lyophilisierten Präparate war eine Funktion der Restfeuchtigkeit: Die Lagerungsverluste der Brucellen waren am geringsten bei einer RF von 5, 2 %, sie stiegen nur unwesentlich bis zu RF-Werten von etwa 2 % an und wurden maximal, sobald 2 % unterschritten wurde. Bei den Salmonellen lagen die geringsten, lagerungsbedingten Absterbequoten ebenfalls bei einer RF von 5, 2 % vor, doch hielt sich der Rückgang bei stärker ausgetrockneten Proben in engeren Grenzen.

5) Während der Haupttrocknungsphase stellte sich bei den Lyophilisationen ein Temperaturgleichgewicht zwischen -17° und -24° C im Trockengut ein.

Für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und für die mir jederzeit gewährte Unterstützung möchte ich Herrn Professor Dr. F. Ulbrich herzlich danken. Mein Dank gilt ebenso dem leitenden Direktor der Veterinärabteilung des Bundesgesundheitsamtes, Herrn Professor Dr. M. Zunker, dessen Entgegenkommen mir einen Arbeitsplatz und die benötigten Mittel sicherte. Weiterhin danke ich Herrn Dr. D. Wiegand für die zahlreichen wertvollen Anregungen und Hinweise und den medizinisch-technischen Assistentinnen Frl. D. Grobbecker und Frl. B. Jonas für ihre uneigennützige Hilfe.

VI. Literaturübersicht

Altmann, R.: Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen. Veit & C., Leipzig (1890)

American Cyanamid Company: Preservation of microbiological assay organismus by direct freezing. Appl. Microbiol. 7, 84 (1959)

Brown, J. H.: The preservation of bacteria in vacuo. Abstr. Bact. 9, 8 (1925)

Brown, J. H.: Vacuum tubes for the storage and shipment of bacteria. Science (N. S.) 64, 429 (1926)

Brown, J. H.: The preservation of bacteria in vacuo II. J. Bact. 23, 44 (1932)

Buxton, A.: Salmonellosis in animals. Commonwealth Agricultural Bureaux Farnham Royal Bucks, England (1957)

Christian, R. T. und J. J. Stockton: The influence of the sealing pressure on survival of Serratia marcescens and Micrococcus pyog. var. aureus desiccated from the frozen state. Appl. Microbiol. 4, 88 (1956)

Cameron, H. S.: The viability of Bruc. abortus. Cornell Vet. 22, 212 (1932)

Drimmelen, G. C. van und H. S. Steyn: The keeping quality of freeze-dried Brucella abortus strain 19 vaccine. J. Gen. Microbiol. 19, 324 (1958)

Elser, W. J., A. R. Thomas und I. G. Steffen: The desiccation of sera and other biological products (including microorganisms) in the frozen state with the preservation of the original qualities of products so treated. J. Immunol. 28, 433 (1935)

Feldmann, S.: Die biologischen Eigenschaften von Bakterien nach Trocknung und Gefriertrocknung. Zbl. f. Bakt. I Orig. 176, 572 (1959)

Ficker, M.: Über Lebensdauer und Absterben von pathogenen Keimen. Ztschr. Hyg. 29, 1 (1898)

Ficker, M.: Über die Resistenz von Bakterien gegenüber dem Trocknen. Ztschr. Hyg. 59, 367 (1908)

Flosdorf, E. W. und G. W. Mudd: Procedure and apparatus for preservation in "lyophile" form of serum and other biological substances. J. Immunol. 29, 389 (1935)

Flosdorf, E. W. un G. W. Mudd: An improved procedure and apparatus for preservation of sera, microorganisms and other substances - the cryochem process. J. Immunol. 34, 469 (1938)

Fry, R. M.: The influence of the suspending fluid on the survival of bacteria after drying. Freezing and Drying. Report of a Symposium. The Institute of Biology, London, S. 107 (1951)

Fry, R. M. und R. I. N. Greaves: The survival of bacteria during and after drying. J. Hyg. 49, 220 (1951)

Germano, E.: Die Übertragung von Infektionskrankheiten durch die Luft. Ztschr. Hyg. 25, 439 (1897)

Greaves, R. I. N.: Centrifugal vacuum freezing. Nature 153, 485 (1944)

Guanieri (1888) zitiert nach Germano

Haines, R. B.: The effect of freezing on bacteria. Proc. Soc. Biol. Sc. London 124, 451 (1938)

Hammer, B. W.: A note on vacuum desiccation of bacteria. J. Med. Res. 24, 527 (1911)

Harris, M. M. und L. B. Lange: A note on the preservation of acidfast bacteria in vacuo. J. Laborat. Clin. Med. 18, 1066 (1933)

Harris, R. J. C.: Biological application of freezing and drying. Academic Press. Inc. Publishers. New York (1954)

Heckly, R. I., K. Faunce und S. S. Elberg: Lyophilization of Brucella melitensis. Appl. Microbiol. 8, 52 (1960)

Heim, L.: Die Widerstandsfähigkeit verschiedener Bakterienarten gegen Trocknung und die Aufbewahrung bakterienhaltigen Materials insbesondere beim Seuchendienst und für gerichtlich-medicinische Zwecke. Ztschr. Hyg. 50, 123 (1905)

Heim, L.: Über Pneumoniecoccen. D. M. W. 33, 1587 (1907)

Heller, G. A.: A quantitative study of environmental factors involved in survival and death of bacteria in the desiccated state. J. Bact. 41, 109 (1941)

Hewitt, L. F.: Oxidation - reduction potentials in bacteriology and biochemistry. VI. Edit. Edinburgh (1950)

Hörter, R.: Überlebensraten von Bakterien nach der Hochvakuumgefriertrocknung. Zbl. Bakt. I Orig. 171, 526 (1958)

Hörter, R.: Überlebensraten von gefriergetrockneten Bakterien nach 2-jähriger Lagerung. Zbl. Bakt. I Orig. 178, 364 (1960)

Hutton, R. S., R. J. Hilmoe und J. Roberts: Some factors that influence the survival of Bruc. abortus during freeze-drying. J. Bact. 61, 309 (1951)

Jendrusch, H.: Untersuchungen zur Herstellung eines wirksamen und standardisierten Brucella-abortus B 19 - Lebendimpfstoffes mit Hilfe der Gefriertrocknung. Arch. exp. Vet. med. 12, 963 (1958)

Kitasato, S.: Die Widerstandsfähigkeit der Cholerabakterien gegen das Eintrocknen und gegen Hitze. Ztschr. Hyg. 5, 134 (1889)

Klöne, W.: Die Gefriertrocknung biologischen Materials Ztschr. Hyg. 133, 180 (1951)

Leach, R. H. und W. J. Scott: The influence of rehydration on the viability of dried micro-organisms. J. Gen. Microbiol. 21, 295 (1959)

Leifson, E.: The preservation of bacteria by drying in vacuo. Amer. J. Hyg. 23, 231 (1936)

Lerche, M. und F. Ulbrich: Trockenimpfstoff zur Schutzimpfung der Kälber gegen Brucellose. Exp. Vet. Med. II, 127 (1950)

Leshinskaya, E. N.: The immunizing value of the BCG dry glucose vaccine.
Problemy tuberculeza 6, 55 (1944)
übersetzt in:
Amer. Rev. Soviet Med. 3, 210 (1946)

Lyet, B.: On the mechanism of growth of icecrystals in aqueous solutions and on the effect of rapid cooling in hindering crystallization.
Recent Reserarch in Freezing and Drying.
Blackwell Sc. Publ. Oxford (1960)

Macfadyen, A.: On the influence of the prolonged action of the temperature of liquid air on micro-organisms, and on the effect of mechanical trituration at the temperature of liquid air on pathogenic bacteria.
Proc. of the Royal Soc., Vol. 71 (1902)

Mazur, P.: The effect of subzero temperatures on micro-organisms.
Recent Research in Freezing and Drying.
Blackwell Sc. Publ. Oxford (1960)

Morton, H. E. und E. J. Pulaski: The preservation of bacterial cultures.
J. Bact. 35, 163 (1938)

Muggleton, P.: Freeze-drying of bacteria with special reference to B. C. G.
Recent Research in Freezing and Drying.
Blackwell Sc. Publ. Oxford (1960)

Naylor, H. B. und P. A. Smith: Factors affecting the viability of Serratia marcescens during dehydration and storage.
J. Bact. 52, 565 (1946)

Nei, T.: Effect of freezing and freeze-drying on microorganisms.
Recent Research in Freezing and Drying.
Blackwell Sc. Publ. Oxford (1960)

Obayashi, Y.: The preservation of B. C. G.
Recent Research in Freezing and Drying.
Blackwell Sc. Publ. Oxford (1960)

Obayashi, Y., S. Ota und S. Arai: Some factors affecting preservability of freezedried bacteria.
J. Hyg. 59, 77 (1961)

Oelfken, H.: Untersuchungen über die Erhaltung der Virulenz einiger Bakterienarten durch die Vakuumgefriertrocknung.
Vet. Med. Diss. Giessen (1955)

Otten, L.: Die Trockenkonservierung von pathogenen Keimen. Zbl. Bakt. I Orig. 116, 199 (1930)

Proom, H.: Some of the factors affecting the viability of bacterial cultures subjected to the freeze-drying process. Freezing and Drying. Report of a Symposium. The Institut of Biology London, S. 117 (1951)

Proom, H. und C. H. Hemmons: The drying and preservation of bacterial cultures. J. Gen. Microbiol. 3, 7 (1949)

Record, B. R. und R. Taylor: Some factors influencing the survival of Bacterium coli on freeze-drying. J. Gen. Microbiol. 9, 475 (1953)

Record, B. R. und R. Taylor: Survival of bacteria on drying in sugar-protein mixtures. Nature 185, 944 (1960)

Rey, L. R.: Importance of the preliminary freezing-period and role of eutectic phenomena in lyophilization. in: Vorträge auf der 4. Gefriertrocknungstagung, 27./28. 4. 1959 Köln.

Rhoades, H. E.: The effect of storage on viability of lyophilized cultures of bacteria, viruses, yeasts, and molds. Amer. J. Vet. Res. 19, 765 (1958)

Rogers, L. A.: The preparation of dried cultures. J. Infect. Dis. 14, 100 (1914)

Scheer, A. F. van der: Observations on the lyophilization of Brucella abortus, Strain 19. I. Improvement of the survival rate. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 22, 193 (1956)

Schmidt, O. C.: Einfluß des Stabilisators, der Lagerungstemperatur und der Restfeuchtigkeit auf die Überlebensrate verschiedener Bakterien nach Lyophilisation. Berlin FU, Vet.-med. Diss. 1957

Schmidt, B., S. Feldmann und H. Dobberstein: Untersuchungen zur Frage der Änderung der biologischen Eigenschaften von Bakterien nach Trocknung und Gefriertrocknung. Zbl. Bakt. I Orig. 172, 573 (1958)

Scott, W. J.: A mechanism causing death during storage of dried microorganisms. Recent Research in Freezing and Drying. Blackwell Sc. Publ. Oxford (1960)

Shackell, L. F.: An improved method of desiccation with some applications to biological problems. Amer. J. Physiol. 24, 325 (1909)

Sizer, I.W. und E.S. Josephson: Kinetics as a function of temperature of lipase, trypsin, and invertase activity from -70° to 50° C (-94° to 122° F). Food Res. 7, 201 (1942)

Stableforth, A.W.: Diskussionsbemerkung in "Freezing and Drying", Report of a Symposium, Institute of Biology, London (1951) s. Proom (1951)

Stamp, L.: The preservation of bacteria by drying. J. Gen. Microbiol. 1, 251 (1947)

Stein, C.D. und H. Rogers: Recovery of viable microorganisms and viruses form vapors removed from frozen suspensions of biologic materials during lyophilization. Am. J. Vet. Res. 11, 339 (1950)

Stille, B.: Untersuchungen über den Kältetod von Mikroorganismen. Arch. Mikrobiol. 14, 554 (1950)

Swift, H.F.: Preservation of stockcultures of bacteria by freezing and drying. J. Exper. Med. 33, 69 (1921)

Swift, H.F.: A simple method for preserving bacterial cultures by freezing and drying. J. Bact. 33, 411 (1937)

Ulbrich, F.: Erfahrungen über die Trocknung biologischen Materials. Mhefte Vet.-med. 19, 379 (1952)

Verwey, W.F.; N.H. Harrington und Clara Matt: Factors influencing the properties of desiccated Brucella abortus vaccine. Vet. Med. 46, 59 (1951)

Voss, H.: Schädigungsmöglichkeiten des Trockengutes in Abhängigkeit von der Dauertemperatur während des Trocknens. in: Vorträge auf der 4. Gefriertrocknungstagung, 27./28.4.1959, Köln

Voss, H.: Die moderne Entwicklung der Gefriertrocknung. Bundesgesundheitsblatt Orig. 12, 177 (1960)

Weiser, R. S. und L. A. Hennum: Studies on the death of bacteria by drying. I. The influence of in vacuo drying, from the frozen state and from the liquid state on the initial mortality and storage behavior of Escherichia coli. J. Bact. 54, 17 (1947)

Weiser, R. S. und C. M. Osterud: Studies on the death of bacteria at low temperatures I. J. Bact. 50, 413 (1945)

Weiser, R. S. und C. M. Osterud: Studies on the death of bacteria at low temperatures II. J. Bact 52, 71 (1946)

VII. Lebenslauf

Am 23. Januar 1935 wurde ich, Alfred Eckhard Scheibner, als Sohn des Studienrates Alfred Scheibner und seiner Ehefrau Hilde, geb. Pötschke, in Zittau geboren. Von 1941 bis 1949 besuchte ich die V. Grundschule in Zittau und trat anschließend auf die dortige Oberschule über, an der ich 1953 die Reifeprüfung ablegte. Im gleichen Jahr übersiedelte ich nach West-Berlin und wurde im Herbst 1954, nach vorherigem Erwerb des Ergänzungsabiturs am Kant-Gymnasium in Berlin-Spandau, an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität immatrikuliert. Hier bestand ich im Oktober 1956 die tierärztliche Vorprüfung und im Februar 1960 die tierärztliche Prüfung. Meine Praktikantenzeit absolvierte ich an der Klinik für Geburtshilfe und Klauentierkrankheiten der Freien Universität. Am 18. August 1960 wurde mir die Approbation als Tierarzt erteilt. Z. Z. bin ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-von-Pettenkofer-Institut des Bundesgesundheitsamtes tätig.